

Aus der Klinik für Dermatologie und Allergologie

Geschäftsführender Direktor:

Prof. Dr. med. Michael Hertl

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg in  
Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und  
Marburg GmbH, Standort Marburg

**Humorale und zelluläre Immunparameter nach  
Abschluss der allergenspezifischen Immuntherapie  
bei Patienten mit Hymenopterengiftallergie**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung  
des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Julia Elisabeth Pickert

aus Itzehoe  
Marburg, 2017

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 24.05.2017

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

|        |                           |
|--------|---------------------------|
| Dekan: | Herr Prof. Dr. H. Schäfer |
|--------|---------------------------|

|           |                            |
|-----------|----------------------------|
| Referent: | Herr Prof. Dr. W. Pfützner |
|-----------|----------------------------|

|                 |                        |
|-----------------|------------------------|
| 1. Korreferent: | Herr Prof. Dr. H. Garn |
|-----------------|------------------------|

# Inhaltsverzeichnis

|   |             |
|---|-------------|
| <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>  | <b>I</b>    |
| <b>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS .....</b>  | <b>III</b>  |
| <b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>   | <b>VI</b>   |
| <b>SUMMARY .....</b>  | <b>VIII</b> |
| <b>1 EINLEITUNG .....</b>   | <b>1</b>    |
| 1.1 <i>Allergische Erkrankungen</i> .....   | 1           |
| 1.2 <i>Allergietypen</i> .....  | 2           |
| 1.2.1 Typ-I-Reaktion (Soforttyp) .....  | 2           |
| 1.2.2 Typ-II-Reaktion (Zytotoxischer Typ) .....   | 2           |
| 1.2.3 Typ-III-Reaktion (Immunkomplex-Typ) .....   | 2           |
| 1.2.4 Typ-IV-Reaktion (Verzögerter Typ) .....   | 3           |
| 1.3 <i>Pathophysiologie der Typ-I-Allergie am Beispiel der Insektengiftallergie</i> ..... | 3           |
| 1.4 <i>Insektengiftallergie</i> .....   | 4           |
| 1.4.1 Epidemiologie der Insektengiftallergie .....  | 7           |
| 1.4.2 Diagnostik der Insektengiftallergie .....   | 7           |
| 1.4.2.2 Hauttests .....   | 10          |
| 1.4.2.3 In-Vitro Tests .....  | 10          |
| 1.5 <i>Humorale Immunantwort der Soforttypallergie</i> .....                              | 11          |
| 1.5.1 Immunglobulin E .....   | 12          |
| 1.5.2 Immunglobulin G .....   | 12          |
| 1.6 <i>T-Zellen im Kontext der Soforttypallergie</i> .....                                | 13          |
| 1.6.1 T-Helfer-Zellen .....   | 14          |
| 1.6.1.1 T-Helfer 2-Zellen .....   | 14          |
| 1.6.1.2 T-Helfer 1-Zellen .....   | 15          |
| 1.6.1.3 T-Helfer 2/T-Helfer 1-Modell .....  | 15          |
| 1.6.2 Regulatorische T-Zellen .....   | 16          |
| 1.6.2.1 CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Tregs .....                                    | 17          |
| 1.6.2.2 Typ-1-regulatorische T-Zellen .....   | 18          |
| 1.7 <i>Therapieformen der Insektengiftallergie</i> .....                                  | 19          |
| 1.7.1 Therapie der akuten Reaktion .....  | 19          |
| 1.7.1.1 Gesteigerte Lokalreaktion .....   | 19          |
| 1.7.1.2 Systemische Reaktion .....  | 20          |
| 1.7.1.2.1 Allgemeine Maßnahmen .....  | 20          |
| 1.7.1.2.2 Medikamentöse Therapie .....  | 20          |
| 1.7.2 Langfristige Therapie .....   | 20          |
| 1.7.2.1 Allergenkarenz .....  | 20          |
| 1.7.2.2 Selbsthilfemaßnahmen des Patienten bei erneutem Stich .....                       | 21          |
| 1.7.2.3 (Allergen-) spezifische Immuntherapie (SIT) .....                                 | 22          |
| 1.7.2.3.1 Klinische Aspekte der SIT .....   | 22          |
| 1.7.2.3.3 Durchführung der SIT .....  | 23          |
| 1.7.2.3.4 Therapiedauer der SIT .....   | 24          |
| <b>2 MATERIAL .....</b>   | <b>27</b>   |
| 2.1 <i>Patientenmaterial</i> .....  | 27          |
| 2.2 <i>Lösungen und Zusätze für die Kultivierung humaner Zellen</i> .....                 | 27          |
| 2.3 <i>Zytokine und Proteinantigene</i> .....   | 27          |
| 2.4 <i>Chemikalien</i> .....  | 27          |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 2.5     | <i>Puffer und Medien</i>  | 28 |
| 2.6     | <i>Antikörper für durchflusszytometrische Analysen</i>  | 29 |
| 2.7     | <i>Kommerzielle Tests für die serologische und zelluläre Diagnostik</i>   | 30 |
| 2.8     | <i>Verbrauchsartikel</i>  | 30 |
| 2.9     | <i>Geräte</i>   | 31 |
| 2.10    | <i>Software</i>   | 32 |
| 3       | <b>METHODEN</b>   | 33 |
| 3.1     | <i>Patienten</i>  | 33 |
| 3.2     | <i>Studiendesign</i>  | 33 |
| 3.3     | <i>Klinische Evaluation</i>   | 34 |
| 3.3.1   | <i>Hauttests</i>  | 35 |
| 3.3.1.1 | <i>Pricktest</i>  | 35 |
| 3.3.1.2 | <i>Intrakutantest</i>   | 36 |
| 3.4     | <i>Serologische Diagnostik</i>  | 36 |
| 3.5     | <i>Zelluläre Diagnostik</i>   | 36 |
| 3.5.1   | <i>Zellseparation mittels Dichtegradienten-Zentrifugation</i>   | 36 |
| 3.5.2   | <i>Zellzahlbestimmung</i>   | 38 |
| 3.5.3   | <i>Kryokonservierung</i>  | 39 |
| 3.5.4   | <i>Auftauen der Zellen</i>  | 39 |
| 3.5.5   | <i>Frequenzanalyse allergenspezifischer Zellen mittels Elispot</i>  | 39 |
| 3.5.6   | <i>Durchflusszytometrie</i>   | 40 |
| 3.6     | <i>Statistik</i>  | 43 |
| 4       | <b>ERGEBNISSE</b>   | 44 |
| 4.1     | <i>Humorale Immunparameter nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie</i>  | 44 |
| 4.1.1   | <i>Gesamt-IgE</i>   | 44 |
| 4.1.2   | <i>Spezifische IgE-Antikörper</i>   | 45 |
| 4.1.3   | <i>Spezifische IgG-Antikörperkonzentrationen</i>  | 46 |
| 4.1.4   | <i>Spezifische IgG4-Antikörper</i>  | 47 |
| 4.2     | <i>Frequenzen Api m 1-spezifischer T-Zellpopulationen nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie</i>                                 | 51 |
| 4.3     | <i>Proportionale Veränderungen der einzelnen T-Zellsubpopulationen nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie</i>                    | 59 |
| 4.4     | <i>Anzahl CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> regulatorischer T-Zellen nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie</i> | 61 |
| 4.5     | <i>Vergleich humoraler Marker mit klinischen Aspekten</i>   | 62 |
| 5       | <b>DISKUSSION</b>   | 66 |
| 5.1     | <i>Immunologische Mechanismen nach Abschluss der SIT</i>  | 66 |
| 5.1.1   | <i>Marker der humoralen Immunantwort nach Abschluss der SIT</i>   | 66 |
| 5.1.1.1 | <i>Gesamt-IgE</i>   | 66 |
| 5.1.1.2 | <i>Allergenspezifisches IgE</i>   | 67 |
| 5.1.1.3 | <i>Allergenspezifisches IgG4</i>  | 69 |
| 5.1.1.4 | <i>IgE/IgG4-Verhältnis</i>  | 70 |
| 5.1.2   | <i>Marker der zellulären Immunantwort nach Abschluss der SIT</i>  | 71 |
| 5.1.2.1 | <i>Frequenzen einzelner T-Zellpopulationen</i>  | 71 |
| 5.1.2.2 | <i>T-Helfer-Zellen nach Abschluss der SIT</i>   | 71 |
| 5.1.2.3 | <i>Regulatorische T-Zellen nach Abschluss der SIT</i>   | 72 |
| 5.1.2.4 | <i>Typ1-regulatorische T-Zellen</i>   | 72 |
| 5.1.2.5 | <i>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> regulatorische T-Zellen</i>   | 73 |
| 5.2     | <i>Eignung der immunologischen Parameter zur Aussage über den bestehenden Schutz gegenüber erneuten Stichen</i>                         | 75 |

|   |                                       |    |
|---|---------------------------------------|----|
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS .....            | 82 |
| 7 | SCHRIFTENVERZEICHNIS .....            | 92 |
| 8 | VERZEICHNIS AKADEMISCHER LEHRER ..... | 93 |
| 9 | DANKSAGUNG .....                      | 94 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                     |  |
|---------------------|--|
| Abb.                | Abbildung  |
| AK                  | Antikörper   |
| APC                 | a) engl.: <i>antigen-presenting cell</i><br>(antigenpräsentierende Zelle(n))<br>b) Allophycocyanin |
| Api m               | lat.: <i>Apis mellifera</i> (Europäische Honigbiene)   |
| BAT                 | Basophilenaktivierungstest   |
| bspw.               | beispielsweise   |
| bzw.                | beziehungsweise  |
| ca.                 | circa  |
| CD                  | engl.: <i>cluster of differentiation</i><br>(Differenzierungskluster)                              |
| DZ                  | dendritische Zelle   |
| ELISPOT – Verfahren | engl.: <i>enzyme-linked immunospot assay</i><br>(enzymgekoppeltes Immunospot-Verfahren)            |
| et al.              | lat.: et alii (und andere)   |
| FACS                | engl.: <i>fluorescence activated cell sorting</i><br>(Durchflusszytometrie)                        |
| FcεR                | Fc epsilon Rezeptor  |
| FITC                | Fluorescein-Isothiocyanat  |
| g                   | Gramm  |
| GATA-3              | GATA-bindendes Protein 3   |
| ggf.                | gegebenenfalls   |
| h                   | Stunde(n)  |
| Hg                  | Hymenopterengift   |
| Ig                  | Immunglobulin  |
| IL                  | Interleukin  |
| IFN                 | Interferon   |
| Iso-K               | Isotypkontrolle  |
| k                   | kilo   |
| Kap.                | Kapitel  |
| KG                  | Körpergewicht  |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|            |   |
|------------|---|
| m          | milli ( $\times 10^{-3}$ )  |
| MHC        | engl.: <i>major histocompatibility complex</i><br>(Haupthistokompatibilitätskomplex)                          |
| o.g.       | oben genannt  |
| p          | Irrtumswahrscheinlichkeit   |
| PBMC       | engl.: <i>peripheral blood mononuclear cells</i><br>(periphere mononukleäre Blutzellen)                       |
| PE         | Phycoerythrin   |
| STAT       | engl.: <i>signal transducer and activator of transcription</i> (Signalüberträger und Transkriptionsaktivator) |
| SIT        | Spezifische Immuntherapie   |
| Tab.       | Tabelle   |
| T-bet      | engl.: <i>T-box expressed in T cells</i> (T-Box exprimiert in T-Zellen)                                       |
| Th-Zelle   | T-Helfer-Zelle  |
| TNF        | Tumornekrosefaktor  |
| Tr1-Zellen | Typ-1-regulatorische T-Zelle  |
| Treg       | regulatorische T-Zelle(n)   |
| UKGM       | Universitätsklinikum Gießen und Marburg<br>GmbH   |
| v.a.       | vor allem   |
| z.B.       | zum Beispiel  |
| °C         | Grad Celsius  |
| $\mu$      | mikro ( $\times 10^{-6}$ )  |

## **Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

### **Abbildungsverzeichnis**

#### Einleitung

- Abb. 1: Taxonomie der Hymenopteren
- Abb. 2: Differenzierung von T-Zellen zu verschiedenen CD4<sup>+</sup> T-Zellsubpopulationen

#### Material und Methoden

- Abb. 3: Darstellung des Patientenkollektivs im zeitlichen Zusammenhang
- Abb. 4: Klassisches Verteilungsmuster vor und nach Dichtegradienten-Zentrifugation
- Abb. 5: Schema eines Dot Plots nach durchflusszytometrischer Analyse

#### Ergebnisse

- Abb. 6: Gesamt-IgE-Antikörperkonzentrationen - zu unterschiedlichen Zeitpunkten - nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT)
- Abb. 7: Allergenspezifische IgE-Antikörperkonzentrationen - zu unterschiedlichen Zeitpunkten - nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT)
- Abb. 8: Allergenspezifische IgG-Antikörperkonzentrationen - zu unterschiedlichen Zeitpunkten - nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT)
- Abb. 9: Allergenspezifische IgG4-Antikörperkonzentrationen - zu unterschiedlichen Zeitpunkten - nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT)



- Abb. 10: Das Verhältnis (Bienen- bzw. Wespengift-) spezifischer IgG4- zu IgG-Antikörper - zu unterschiedlichen Zeitpunkten - nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT)
- Abb. 11: Das Verhältnis (Bienengift- bzw. Wespengift-) spezifischer IgE- zu IgG4-Antikörper – zu unterschiedlichen Zeitpunkten - nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT)
- Abb. 12: Das Verhältnis (Bienengift- bzw. Wespengift-) spezifischer IgE- zu IgG-Antikörper – zu unterschiedlichen Zeitpunkten - nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT)
- Abb. 13: Die quantitative Bestimmung zytokinproduzierender Zellen mit Hilfe des ELISPOT-Verfahrens
- Abb. 14a/b/c: Frequenzen IL-5 positiver Spots unter 0,01/1/2,5µg/ml Api m 1 Primärstimulation
- Abb. 15: Vergleich verschiedener Ansätze zur Restimulation im Rahmen der ELISPOT-Analyse
- Abb. 16: Vergleich verschiedener Ansätze zur Restimulation im Rahmen der ELISPOT-Analyse
- Abb. 17a/b: Die Frequenz Interleukin-5-produzierender Zellen nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT)
- Abb. 18: Die Frequenz Interleukin-10-produzierender Zellen nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT)
- Abb. 19: Die Frequenz Interferon-γ-produzierender Zellen nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT)
- Abb. 20: Verhältnis Api m 1-spezifischer T-Helfer (Th) 2- zu Th1-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT)
- Abb. 21: Verhältnis Api m 1-spezifischer T-Helfer (Th) 2- zu Typ-1-regulatorischen-T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT)

- Abb. 22: Die Frequenz  $CD4^+CD25^+CD127^{low}$  regulatorischer T (Treg)-Zellen nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT)
- Abb. 23: Spezifische IgE-Antikörper bei Patienten ohne bzw. mit allergischer Reaktion infolge einer Stiche des ehemals allergieauslösenden Insekts nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT)
- Abb. 24: Das Verhältnis Hymenopterengift-spezifischer IgG4- zu IgG-Antikörper bei Patienten ohne und mit allergischer Reaktion infolge einer Stiche des ehemals allergieauslösenden Insekts nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT)

### **Tabellenverzeichnis**

#### Einleitung

- Tab. 1: Allergene des Bienen- und Wespengifts
- Tab. 2: Aufschluss über das Insekt
- Tab. 3: Schweregradskala zur Klassifizierung anaphylaktischer Reaktionen nach Ring und Messmer
- Tab. 4: Risikofaktoren für erhöhte Exposition
- Tab. 5: Risikofaktoren für schwere anaphylaktische Stichreaktion
- Tab. 6: Verhaltensregeln zur Vermeidung eines Insektenstichs

#### Material und Methoden

- Tab. 7: Zusammenfassung der Patienten zu unterschiedlichen Kollektiven

### **Zusammenfassung**

Seit über einem Jahrhundert wird die spezifische Immuntherapie (SIT), auch Hypo- oder Desensibilisierung genannt, zur Behandlung von Soforttypallergien eingesetzt. Bei diesem Allergietyp kommt es durch wiederholten Allergenkontakt zur Quervernetzung der auf der Oberfläche von basophilen und eosinophilen Granulozyten oder Mastzellen gebundenen IgE-Antikörper mit konsekutiver Zellaktivierung und Freisetzung von Histamin bzw. weiterer proinflammatorischer Mediatoren, die letztendlich zu den typischen allergischen Symptomen führen. Insbesondere bei der Insektengiftallergie kann es im Rahmen von Stichreaktionen zu lebensbedrohlichen anaphylaktischen Reaktionen kommen.

Die SIT stellt nach wie vor die einzige, kausale Behandlungsform dar, die in der Lage ist, den natürlichen Krankheitsverlauf von Soforttypallergikern positiv zu beeinflussen. In zahlreichen klinischen Studien wurde die kurative Wirksamkeit belegt. Die der SIT zugrunde liegenden immunologischen Mechanismen sind seit Jahrzehnten Gegenstand der Forschung. Während die Veränderungen, die zur Induktion der Allergentoleranz führen, bereits besser erforscht sind, sind die Mechanismen, die der Aufrechterhaltung der Toleranz auch nach Abschluss der SIT dienen, noch weitestgehend ungeklärt. Zwar ist gezeigt, dass bei ca. 90-95% der Insektengiftallergiker während der SIT eine Toleranz erreicht wird, allerdings ist auch bekannt, dass ca. 15% die erworbene Toleranz innerhalb weniger Jahre nach Beendigung der SIT wieder verlieren. Bislang gibt es allerdings keine Laborparameter, welche eine weiterhin bestehende Toleranz bzw. einen drohenden Toleranzverlust, der mit wiederkehrenden lebensgefährlichen Anaphylaxien einhergehen kann, zuverlässig voraussagt.

Mit dieser „diagnostischen Lücke“ beschäftigt sich die vorliegende Studie. Es wurden Patienten, die eine SIT mit Bienen- oder Wespengift bereits vor 4-13 Jahren abgeschlossen haben, bezüglich verschiedener zellulärer und humoraler Immunparameter untersucht. Die Patienten wurden, je nach Zeitraum, der seit Beendigung der SIT vergangen war, in Gruppen eingeteilt. Vergleichend wurde diesen Kohorten eine Kontrollpopulation bestehend aus gesunden Probanden ohne Manifestation einer IgE-vermittelten Allergie gegenübergestellt.

Die Analysen unterschiedlicher T-Zellpopulationen zeigten bezüglich der allergenspezifischen T-Zellfrequenzen für T-Helfer (Th)2-, Th1- und Typ-1-regulatorischen T (Tr1)-Zellen zwar signifikante Abweichungen in Hinblick auf das Kontrollkollektiv, jedoch bei den Th1- und Tr1-Zellen nicht im Vergleich der einzelnen Patientengruppen nach abgeschlossener SIT untereinander. Für die allergenspezifischen Th2-Zellen hingegen zeigte sich eine (bei einer Subpopulation auch signifikante) Zunahme der allergenspezifischen Th2-Zellen, je länger die SIT zurücklag. Die Frequenz unspezifischer Foxp3<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen, ermittelt durch das Expressionsmuster der Oberflächenmarker CD4, CD25 und CD127, zeigte hingegen weder innerhalb der Patientengruppen noch gegenüber dem Kontrollkollektiv Abweichungen.

Um die humorale Immunantwort nach Abschluss der SIT zu charakterisieren, wurden für die einzelnen Patientengruppen die Serumkonzentrationen der allergenspezifischen IgE-, IgG- und IgG4-Antikörper und ebenso die quantitativen Verhältnisse der unterschiedlichen Antikörperklassen zueinander ermittelt. Hier zeigten sich wiederum signifikante Unterschiede im Vergleich zum Kontrollkollektiv, jedoch konnten keine signifikanten Abweichungen der Patientengruppen untereinander festgestellt werden. In einer Subgruppenanalyse konnten bezüglich der beschriebenen Parameter zudem keine Unterschiede zwischen den Patienten ermittelt werden, die mehrere Jahre nach Beendigung der SIT mit einer (erneuten) allergischen Reaktion auf einen Feldstich reagierten, und denen mit ausbleibender Stichreaktion (die also nach wie vor tolerant waren).

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen somit, dass die Aufrechterhaltung von Allergentoleranz bzw. der Toleranzverlust nach SIT nicht nur von den in dieser Studie quantitativ bestimmten, immunologischen Parametern abhängt, sondern maßgeblich auch von anderen, qualitativen Faktoren abzuhängen scheint, wie bspw. der allergenblockierenden Aktivität des Serums.

### Summary

For over a century, specific immunotherapy (SIT), also known as hypo- or desensitization, has been used to treat immediate-type allergies. In this type of allergy, repeated allergen contact results in cross-linking of IgE-antibodies bound to the surface of basophilic and eosinophilic granulocytes or mast cells with consecutive cell activation and release of histamine or other pro-inflammatory mediators ultimately leading to typical allergic symptoms. Particularly, in the case of insect venom allergy stings of e.g. bees or wasps can lead to life-threatening anaphylactic reactions.

To date, SIT is still the only causal treatment capable of positively affecting the natural course of the disease in patients suffering from immediate-type allergies. Numerous clinical studies have demonstrated the curative efficacy of SIT. However, the underlying immunological mechanisms of this therapy have been subject of research for decades. While the immune alterations leading to induction of allergen tolerance are already being investigated, the mechanisms responsible for maintenance of tolerance even after SIT remain largely unexplained. Although it has been shown that approximately 90-95% of insect venom allergic patients will gain tolerance during SIT, however, it is also known that approximately 15% will lose the acquired tolerance within a few years after cessation of therapy. So far, there are no laboratory biomarkers which reliably predict either a continuing tolerance or an imminent tolerance loss, which may be associated with recurring life-threatening anaphylaxis.

The present study was conducted to fill this "diagnostic gap". Patients allergic to bee or venom who have completed SIT between 4-13 years ago were examined for different cellular and humoral immune parameters. Depending on the time period since termination of SIT, patients were divided into four cohorts. In addition, a control population consisting of healthy subjects without manifestation of an IgE-mediated allergy was compared to the allergic groups.

The analysis of different T-cell populations showed significant deviations in allergen-specific T-cell frequencies for T-helper (Th) 2, Th1 and Type 1 regulatory T (Tr1) cells between patients and healthy control subjects. In contrast, there were no significant changes of Th1 or Tr1 cells comparing the patient groups after finishing SIT. Only for allergen-specific Th2 cells an

increase by trend could be observed (which was actually significant for a subpopulation of the allergic patients) the longer the SIT dated back. The frequency of non-specific Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells, as determined by the expression pattern of the surface markers CD4, CD25 and CD127, remained unchanged in both the patient cohorts and in comparison to the control group.

In order to characterize the humoral immune response after completion of SIT, serum concentrations of allergen-specific IgE, IgG and IgG4 antibodies were determined for the individual patient groups as well as the respective ratios of the different antibody classes. Significant differences could be demonstrated for the insect venom-allergic patients in comparison to the healthy controls, however, among the four patient cohorts serum concentrations were constant. In further subgroup analyses between patients who reacted again to a field sting several years after the end of SIT, and those who had no anaphylactic sting reaction after a re-experienced field sting (i.e. patients who were still tolerant), showed no alterations in the investigated parameters.

Thus, the data showed that both maintenance and loss of allergen tolerance after SIT is not only dependent on the immunological parameters determined quantitatively in this study, but rather essentially based on other, qualitative factors such as Allergen-blocking serum activity.

# 1 Einleitung

## 1.1 Allergische Erkrankungen

Der Begriff „Allergie“ wurde 1906 erstmalig von dem Wiener Kinderarzt Clemens von Pirquet (1874-1929) eingeführt. Pirquet verstand darunter – ausgehend von seinen Studien auf dem Gebiet der Infektiologie und Immunologie – allgemein eine Veränderung der Reaktionsfähigkeit des Organismus in zeitlicher, qualitativer und quantitativer Hinsicht. Eine „Allergie“ umfasste in Pirquets Sinne gleichermaßen Steigerungen und Verminderungen der Reaktionsfähigkeit und umschloss somit sowohl „Über-“ als auch „Unterempfindlichkeitsreaktionen“. Schon damals wies Pirquet darauf hin, dass diese Änderung der Reaktionsfähigkeit von äußeren Substanzen, aber auch von organismuseigenen Faktoren abhängen könnte (Huber, 2006).

Heute, mehr als 100 Jahre später, wird der Begriff „Allergie“ restriktiver verwendet. Er dient der Beschreibung von Überempfindlichkeitsreaktionen und wird oft synonym zur Immunglobulin (Ig)E-vermittelten Soforttypreaktion (Typ-I-Allergie) verwendet (Kay, 2000).

Bei allergischen Patienten kommt es zu Überempfindlichkeitsreaktionen gegen an sich harmlose Umweltantigene, welche in diesem Kontext auch Allergene genannt werden (King et al., 1994). Klassische Allergene sind Pollen, Hausstaub, Nahrungsmittel, Insektengift, Tierhaare oder Medikamente. Der Kontakt mit dem Allergen kann nach einer Sensibilisierungsphase zu typischen allergischen Symptomen wie Rhinokonjunktivitis, Urtikaria, Angioödem, Bronchokonstriktion mit Atembeschwerden und kardiogenem Schock mit Kreislaufversagen bis hin zum Tod führen. Anaphylaktische Reaktionen treten vorwiegend bei Medikamenten (z.B. Penicillin), Insektengift und Nahrungsmitteln (z.B. Erdnüsse, Paranüsse) auf (Jutel et al., 2006a).

## **1.2 Allergietypen**

Allergien werden immunologisch in vier Gruppen nach Coombs und Gell eingeteilt. Diese Einteilung basiert auf den Effektormechanismen, die der Immunantwort gegen das Allergen zugrunde liegen (Gell, 1963).

### **1.2.1 Typ-I-Reaktion (Soforttyp)**

Bei der Typ-I-Reaktion handelt es sich um eine durch IgE-Antikörper vermittelte Hypersensitivitätsreaktion gegen Umweltantigene wie z.B. Pollen, Tierepithelien, Hausstaub, Nahrungsmittel oder Insektengift. Die Bildung der spezifischen, gegen das Allergen gerichteten IgE-Antikörper wird im Rahmen einer Sensibilisierungsphase induziert und kann bei erneutem Allergenkontakt innerhalb weniger Minuten zu IgE-vermittelten allergischen Symptomen führen. Diese können sich z.B. in Form einer Rhinokonjunktivitis, Asthma bronchiale, Erbrechen, Durchfall oder kardiogenem Schock äußern (Hof, 2009).

### **1.2.2 Typ-II-Reaktion (Zytotoxischer Typ)**

Typ-II-Reaktionen sind nicht selten medikamentös bedingt. Nach Applikation bestimmter Medikamente (insbesondere Antibiotika, Analgetika, Antikonvulsiva) lagern sich diese an körpereigene Zellen (z.B. Erythrozyten) an. Es entstehen antigene Oberflächenstrukturen, die von IgG-Antikörpern erkannt und gebunden werden. Es kommt zur antikörperbedingten Lyse über Fc-Rezeptor-vermittelte Phagozytose, Komplementaktivierung oder mittels natürlicher Killerzellen. Zu den zytotoxischen Reaktionen gehören die Transfusionsreaktion und die Überempfindlichkeitsreaktionen gegen Medikamente mit hämolytischer Anämie, Granulozytopenie oder Thrombopenie. Klinische Symptome sind u.a. Blässe, Müdigkeit, Tachykardie, Ikterus und Splenomegalie (Hof, 2009).

### **1.2.3 Typ-III-Reaktion (Immunkomplex-Typ)**

Die Typ-III-Hypersensitivitätsreaktion wird durch die Komplexbildung von freien Allergenen und IgM- oder IgG-Antikörpern bedingt. Diese kann bei Antikörper- oder Antigenüberschuss auftreten (Hof, 2009). Durch Ablagerung der Antigen-Antikörperkomplexe in Organen (Gefäße, Gelenke) kommt es circa 4-6h nach Allergenkontakt durch Aktivierung des Komplementsystems zur Infiltration des Gewebes mit Makrophagen und Granulozyten. Klinische Folgen sind u.a.



hämorrhagische Vaskulitiden, Alveolitis mit Atembeschwerden und Arthritiden. Die systemische Serumkrankheit (urtikarielles Exanthem, Fieber, Lymphknotenschwellung) kann zudem innerhalb der Typ-III-Reaktionen von der lokalisierten Arthus-Reaktion unterschieden werden (Hahn, 2008).

### **1.2.4 Typ-IV-Reaktion (Verzögerter Typ)**

Bei der Typ-IV-Reaktion handelt es sich um eine durch allergenspezifische T-Zellen vermittelte Hypersensitivitätsreaktion. Auslöser können Peptide (die sich als Haptene an körpereigene Proteine anlagern), Metallionen und Proteine (z.B. Gluten) sein. Im Rahmen der Reaktion kommt es zu einem Übergang von Monozyten und anderen proentzündlichen Leukozyten in das betroffene Gewebe sowie zur Ausschüttung von Zytokinen. Symptome treten ca. 24-48h nach Allergenkontakt auf. Aus diesem Grund wird auch von einer Allergie vom verzögerten Typ gesprochen. Klassisches Beispiel stellt die allergische Kontaktdermatitis dar (Hof, 2009).

## **1.3 Pathophysiologie der Typ-I-Allergie am Beispiel der Insektengiftallergie**

Typ-I-Allergien verlaufen in mehreren Phasen: Zunächst setzt die allergische Reaktion auf ein Allergen eine Sensibilisierung voraus. Insofern verläuft der erste Kontakt mit dem Allergen symptomlos. Im Rahmen der Insektengiftallergie kann ein einziger Bienen- oder Wespenstich für eine Sensibilisierung auf das entsprechende Allergen ausreichen (Golden et al., 1997). Durch den Stich des Insekts gelangen die Bestandteile des Gifts in die Haut und werden von antigenpräsentierenden Zellen (*antigen-presenting cells*, APC) wie z.B. Langerhans-Zellen in der Epidermis oder dendritischen Zellen (DZ) in der Dermis aufgenommen, prozessiert und nach Transport in den Lymphknoten über Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*; MHC) Klasse II-Oberflächenproteinen naiven T-Helfer (Th)-Zellen präsentiert. Unter dem Einfluss von IL-4, -5 und -13 kommt es zur Differenzierung der naiven Th-Zellen zu allergieassoziierten Th2-Zellen (Ozdemir et al., 2011). Die Zytokine, die von den Th2-Zellen produziert werden, führen nach Aktivierung von B-Zellen zum Ig-Klassenwechsel Antikörper-sezernierender Plasmazellen von IgM

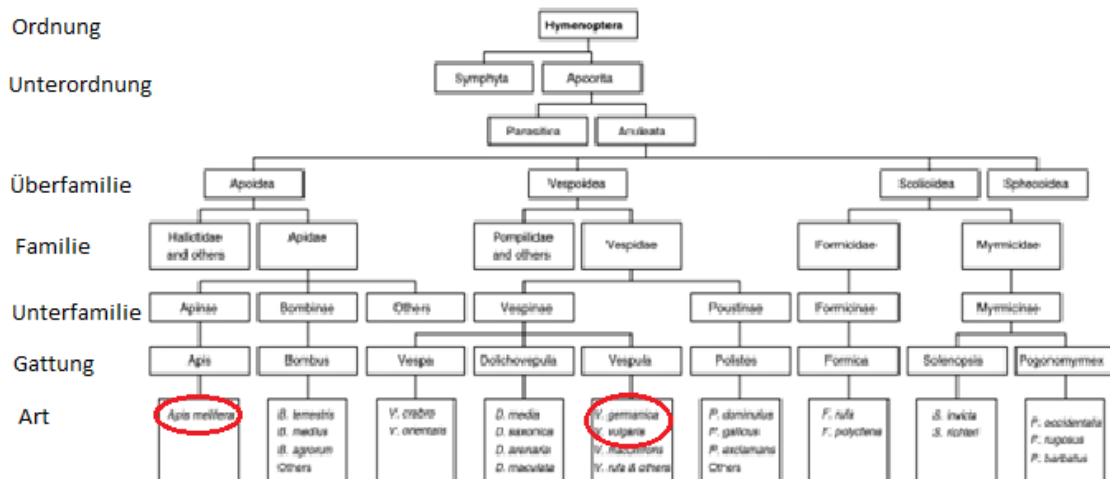
zu IgE, zur weiteren klonalen Expansion von IgE-exprimierenden B-Gedächtniszellen und zur Aktivierung, Differenzierung und Rekrutierung von Eosinophilen (IL-5 (Romagnani, 2004)). Sezerniertes allergenspezifisches IgE wird über den hochaffinen IgE-Rezeptor (FcεRI) auf der Oberfläche von Effektorzellen der Allergie (Mastzellen, Basophile, Eosinophile) gebunden (Ozdemir et al., 2011). Durch erneute Exposition mit dem sensibilisierenden Allergen kommt es zur Quervernetzung zweier nebeneinanderliegender IgE-Antikörpermoleküle (Hahn, 2008). Dies führt zu einer raschen Degranulation der Effektorzellen mit Ausschüttung vasoaktiver Mediatoren (insbesondere Histamin), Lipidmediatoren (Prostaglandine, Leukotriene), Zytokinen und Chemokinen (Akdis, 2006). Diese Mediatoren wirken proinflammatorisch und haben unterschiedliche Wirkungen auf bspw. Blutgefäße, Bronchiolen und glatte Muskulatur. So führt Histamin zur Konstriktion der Venolen, Dilatation der Arteriolen und erhöht die Gefäßpermeabilität. Zusätzlich kann es eine Kontraktion der Bronchialmuskulatur und eine erhöhte Schleimproduktion bewirken (Hahn, 2008).

Des Weiteren bindet IgE an FcεRI auf der Oberfläche von DZ und Monozyten und an den niedrig-affinen FcεRII (CD23)-Rezeptor auf B-Zellen. Dies führt zu einer verstärkten Präsentation der Allergene durch diese auch als APC tätigen Zellen, welche eine zweite Phase der IgE-vermittelten Reaktion (sogenannte Spätreaktion) begünstigt, die klinisch v.a. durch bronchitische Symptome geprägt ist (Robinson et al., 2004).

### **1.4 Insektengiftallergie**

Die Häufigkeit systemischer Überempfindlichkeitsreaktionen auf Insektenstiche beträgt in Europa in der Allgemeinbevölkerung zwischen 0,3-7,5% (vgl. 1.4.1).

Die Familie der Hymenoptera setzt sich aus einer Vielzahl von Spezies zusammen, zu denen auch die Bienen und Wespen gehören (siehe Abb. 1).



**Abb. 1:** Die Taxonomie der Hymenopteren (modifiziert nach Bilo et al., 2005) Eingekreist sind die für Anaphylaxien quantitativ relevantesten Arten: *Apis mellifera* sowie *Vespula germanica* und *Vespula vulgaris*.

Insektenstiche sind in Deutschland die häufigste Ursache für Anaphylaxien (Hompes & Henzgen, 2008). Die meisten systemischen Überempfindlichkeitsreaktionen werden durch Stiche der Honigbiene (*Apis mellifera*, im Folgenden als Biene bezeichnet) oder bestimmte Spezies der Faltenwespe (*Vespula germanica*, *Vespula vulgaris*, im Folgenden als Wespe bezeichnet) ausgelöst. Stiche anderer Hymenopterenarten, wie Hummeln (*Bombus spp.*), weiterer Faltenwespen (*Dolichovespula spp.*) oder Hornissen (*Xylocopa spp.*), führen nur in seltenen Fälle zu anaphylaktischen Reaktionen (Ruëff et al., 2000).

Das Gift der Biene und Wespe setzt sich aus unterschiedlichen Komponenten zusammen. Bei den meisten Komponenten handelt es sich um Glykoproteine mit einem Molekulargewicht zwischen 10-50kDa, die sich aus 100-400 Aminosäuren zusammensetzen.

Bei den Bestandteilen des Bienen- und Wespengifts wird zwischen Major- und Minorallergenen unterschieden. Ein Majorallergen ist eine Substanz, die von mehr als 50% (ein Minorallergen von weniger als 50%) der allergischen Personen erkannt wird und eine spezifische Immunantwort auslöst (Chapman, 2008). Die Diagnostik mittels Giftextrakten führte in der Vergangenheit aufgrund kreuzreagierender Kohlenhydratseitenketten zu einer Doppelpositivität gegen

Bienen- und Wespengift, auch bei Allergikern, die nur gegen ein Gift sensibilisiert sind (Köhler et al., 2014). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit im Sinne einer speziesspezifischen Diagnostik Antikörper gegen das Majorallergen Api m 1 (Phospholipase A2) des Bienengifts und die zwei Majorallergene des Wespengifts, Ves v 1 (Phospholipase A1B) und Ves v 5 (Antigen 5), untersucht. Die weiteren Bestandteile des Bienen- und Wespengifts sind in Tab. 1 aufgeführt.

**Tab. 1:** Allergene des Bienen- und Wespengifts (hervorgehoben sind die jeweiligen Majorallergene)

| <b>Gift</b>                    | <b>Allergen</b> | <b>Eigenname</b>                              | <b>Molekulargewicht</b> |
|--------------------------------|-----------------|---|-------------------------|
| <b><i>Apis mellifera</i></b>   | <b>Api m 1</b>  | Phospholipase A2                              | 16 kDa                  |
|                                | Api m 2         | Hyaluronidase                                 | 39 kDa                  |
|                                | <b>Api m 3</b>  | Saure Phosphatase                             | 43 kDa                  |
|                                | Api m 4         | Mellitin                                      | 3 kDa                   |
|                                | <b>Api m 5</b>  | Dipeptidylpeptidase IV                        | 100 kDa                 |
|                                | Api m 6         | -   | 8 kDa                   |
|                                | Api m 7         | CUB serine protease                           | 39 kDa                  |
|                                | Api m 8         | Carboxylesterase                              | 70 kDa                  |
|                                | Api m 9         |   |                         |
|                                | Api m 9         | Serine carboxypeptidase                       | 60 kDa                  |
|                                | <b>Api m 10</b> | Icarapin variant 2, carbohydrate-rich protein | 50-55 kDa               |
|                                | Api m 11        | Major royal jelly protein                     | 50 kDa                  |
|                                | Api m 12        | Vitellogenin                                  | 200 kDa                 |
| <b><i>Vespula vulgaris</i></b> | <b>Ves v 1</b>  | Phospholipase A1B                             | 34 kDa                  |
|                                | Ves v 2         | Hyaluronidase                                 | 38 kDa                  |
|                                | Ves v 3         | Dipeptidylpeptidase IV                        | 100 kDa                 |
|                                | <b>Ves v 5</b>  | Antigen 5                                     | 23 kDa                  |
|                                | Ves v 6         | Vitellogenin                                  | 200 kDa                 |

(modifiziert nach [www.allergen.org](http://www.allergen.org))

Bei einem Bienenstich werden 50-140µg Protein abgegeben, während bei einem Wespenstich etwa 1,7-3,1µg Protein sezerniert werden (Hoffman & Jacobson, 1984; Schumacher et al., 1994). Die Standarderhaltungsdosis des bei der SIT applizierten Hymenopterengifts beträgt sowohl für Bienen– als auch Wespengiftallergie 100µg.

#### **1.4.1 Epidemiologie der Insektengiftallergie**

Die Prävalenz in Europa für gesteigerte lokale Reaktionen (bezeichnet eine im Durchmesser mehr als 10 cm große erythematöse Schwellung, die länger als 24h persistiert, meist schmerzhaft ist und auch eine nichtinfektiöse Lymphangitis hervorrufen kann) auf Insektenstiche wird in der Literatur von 2,4 bis hin zu 26,4% beschrieben (Fernandez et al., 1999; Golden et al., 1989a; Grigoreas et al., 1997; Incorvaia et al., 1997; Przybilla et al., 2011). Bei Kindern finden sich Angaben von 19%, bei Imkern bis zu 38% (Annala et al., 1996; de la Torre-Morin et al., 1995).

Epidemiologische Studien beschreiben die Prävalenz von systemischen Reaktionen auf Insektengift in der Allgemeinbevölkerung zwischen 0,3 und 7,5% (Bjornsson et al., 1995; Charpin et al., 1992; Fernandez et al., 1999; Grigoreas et al., 1997; Incorvaia et al., 1997; Kalyoncu et al., 1997; Novembre et al., 1998; Schäfer & Przybilla, 1996; Strupler et al., 1997). Für Kinder in Europa und den USA finden sich Prävalenzen zwischen 0,15 und 0,3% (Novembre et al., 1998), Imker weisen eine Prävalenz systemischer Reaktionen zwischen 14 und 43% auf (Annala et al., 1996; Bousquet et al., 1984).

Jährlich werden durch das Statistische Bundesamt etwa 20 Todesfälle infolge von Stichreaktionen erfasst, es handelt sich weitestgehend um Erwachsene, zwei Drittel davon sind Männer (Przybilla et al., 2011). Es wird vermutet, dass die Dunkelziffer aufgrund häufig unerkannter Anaphylaxien weitaus höher liegt (Klein & Yocum, 1995).

#### **1.4.2 Diagnostik der Insektengiftallergie**

Ziele der Diagnostik sind die Klassifikation der Reaktion nach klinischen Kriterien und je nach Reaktion der Nachweis einer IgE-vermittelten Insektengiftsensibilisierung, die Identifizierung des allergieauslösenden Insekts und außerdem die Einschätzung des individuellen Anaphylaxierisikos des Patienten (Przybilla et al., 2011). Eine über die Anamnese hinausgehende Diagnostik sollte nämlich nur dann vorgenommen werden, wenn der Patient über eine systemische Reaktion in zeitlichem Zusammenhang mit einem Insektenstich berichtet. Denn bei ungefähr einem Viertel der Allgemeinbevölkerung können durch Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper

und/oder Hauttests Anhaltspunkte für eine Sensibilisierung detektiert werden, wobei eine klinisch manifeste Allergie nur selten vorliegt (Golden et al., 1989a; Schäfer & Przybilla, 1996).

#### 1.4.2.1 Anamnese

Bei der Anamnese sollten folgende Informationen erhoben werden: Zeitpunkt und Anzahl der Stichereignisse, Art und Schweregrad der Symptome (lokal/systemisch), Zeitraum zwischen Stichereignis und Reaktion, Notfalltherapie, auslösendes Insekt und Umstände des Stichereignisses. Risikofaktoren für eine gesteigerte Stichreaktion oder für eine erhöhte Exposition sowie tolerierte Stichereignisse nach der ersten systemischen Reaktion sollten ebenfalls eruiert werden (Bilo et al., 2005). Angaben, die Aufschluss über das allergieauslösende Insekt geben können, sind in Tab. 2 dargestellt.

**Tab. 2:** Aufschluss über das Insekt (modifiziert nach Przybilla & Ruëff, 2010)

| <b>Biene</b>  | <b>Wespe</b>                |
|---|-----------------------------|
| eher friedlich (außer in der Nähe des Bienenstocks) | eher aggressiv              |
| Frühling bis Sommer aktiv                           | Sommer bis Spätherbst aktiv |
| Stachel verbleibt in der Haut                       | Insekt behält den Stachel   |
| Umgebung: Blumen, Bienenstock                       | Umgebung: Nahrungsmittel    |

Anhand anamnestischer Angaben und – im Falle einer klinischen Untersuchung direkt nach Stichereignis (Inspektion des Körpers, Blutdruckmessung etc.) - können die Symptome in lokale Stichreaktionen und systemische Reaktionen eingeteilt werden. Lokale Stichreaktionen wiederum werden in umschriebene Schwellung/Rötung (bis 10cm Durchmesser, Abklingen innerhalb 24h) und gesteigerte örtliche Reaktionen (Durchmesser >10cm, teilweise Persistenz über mehr als 24h) unterteilt. Die systemischen Reaktionen können nach Ring und Messmer in vier Anaphylaxiegrade eingeteilt werden (Ring & Messmer, 1977) vgl. Tab. 3).

**Tab. 3:** Schweregradskala zur Klassifizierung anaphylaktischer Reaktionen nach Ring und Messmer, modifiziert nach Ring et al., 2007)

| <b>Grad</b>  | <b>Haut</b>                                 | <b>Abdomen</b>          | <b>Respirationstrakt</b>                         | <b>Herz-Kreislauf</b>   |
|--|---|-------------------------|--|---|
| <b>I</b>   | Juckreiz<br>Flush<br>Angioödem<br>Urtikaria |                         |  |   |
| <b>II</b>  | Juckreiz<br>Flush<br>Angioödem<br>Urtikaria | Nausea<br>Krämpfe       | Rhinorrhö<br>Heiserkeit<br>Arrhythmie<br>Dyspnoe | Tachykardie<br>(Anstieg > 20/min)<br>Hypotonie<br>(Abfall > 20mmHG) |
| <b>III</b>   | Juckreiz<br>Flush<br>Angioödem<br>Urtikaria | Erbrechen<br>Defäkation | Larynxödem<br>Bronchospasmus<br>Zyanose          | Schock  |
| <b>IV</b>  | Juckreiz<br>Flush<br>Angioödem<br>Urtikaria | Erbrechen<br>Defäkation | Atemstillstand                                   | Kreislaufstillstand   |
| Die Klassifizierung erfolgt nach den schwersten aufgetretenen Symptomen.<br>(kein Symptom ist obligat) |   |                         |  |   |

Die folgenden Risikofaktoren sollten anamnestisch erhoben werden (siehe Tab. 4 und 5):

**Tab. 4:** Risikofaktoren für erhöhte Exposition (modifiziert nach Przybilla & Ruëff, 2010)

| <b>Risikofaktoren für erhöhte Exposition</b>  |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- Imker, deren Familie und Nachbarn</li> <li>- Berufe: Obstverkäufer, Bäcker, Bauern, Feuerwehrmänner, Forstwirte</li> <li>- Freizeitaktivitäten: Schwimmen, Gartenarbeit, Golfspielen, Fahrradfahren, Motorradfahren</li> </ul> |

**Tab. 5:** Risikofaktoren für schwere anaphylaktische Stichreaktion (modifiziert nach Przybilla & Ruëff, 2010)

---

**Risikofaktoren für schwere anaphylaktische Stichreaktion**

---

- Vorausgegangene schwere Stichreaktionen (Grad III/IV, signifikante Bronchokonstriktion)
  - Alter über 40 Jahre
  - Kardiovaskuläre Vorerkrankungen
  - Asthma
  - Medikamente: z.B. Betablocker, ACE-Hemmer, gegebenenfalls NSAR
  - Physischer oder psychischer Stress
  - Basale Serumtryptase >11,4µg/l
  - Mastozytose
- 

#### **1.4.2.2      Hauttests**

Für die Hauttestung stehen sowohl der Pricktest als auch der Intrakutantest zur Verfügung. Die Testung kann üblicherweise ambulant durchgeführt werden. Bei Patienten mit erhöhtem Risiko für Anaphylaxie muss unter besonderen Sicherheitsvorkehrungen mit verlängerter Nachbeobachtung getestet werden. Die Testung sollte aufgrund einer möglichen Refraktärphase frühestens zwei Wochen nach dem Stichereignis durchgeführt werden. Bei negativem Ergebnis trotz positiver Anamnese für eine systemische Reaktion ist eine Wiederholung des Tests nach 1-2 Monaten empfohlen (Müller, 1990). Zudem wird diskutiert, ob ein zweimaliger Test unmittelbar nach dem Stich und nach weiteren 4-6 Wochen zuverlässiger sein könnte (Goldberg & Confino-Cohen, 1997).

#### **1.4.2.3      In-Vitro Tests**

Zur In-vitro-Diagnostik zählt insbesondere die Bestimmung von Insektengift-spezifischen IgE-Antikörpern. Hier hat sich in den letzten Jahren die rekombinante Allergiediagnostik etabliert. Insbesondere die Bestimmung von Majorallergenen erhöht die Sensitivität und Spezifität der Testverfahren deutlich (Köhler et al., 2014). Die spezifischen Antikörper werden mittels kommerzieller Testverfahren im Serum bestimmt.



Es ist beschrieben, dass es in den ersten Tagen und Wochen nach Stich aufgrund eines Allergenboostereffekts zum Anstieg des spezifischen IgE kommt (Light et al., 1977; Parker et al., 1982). Zur Identifikation des Allergie auslösenden Insekts kann es sinnvoll sein, das spezifische IgE sowohl direkt nach dem Stich als auch nach 4-6 Wochen zu messen (Goldberg & Confino-Cohen, 1997).

Andere In-vitro-Untersuchungen sind erforderlich, wenn Hymenopterengift (Hg)-spezifisches IgE im Serum auch bei wiederholter Bestimmung nicht nachweisbar ist und unter Berücksichtigung von Anamnese und Hauttestergebnissen keine Therapie-relevante Diagnose gestellt werden kann. In Betracht kommen in diesem Zusammenhang v.a. Histamin- oder Leukotrienfreisetzungstest, Basophilenaktivierungstest und Immunoblot (Ruëff et al., 2000).

### **1.5 Humorale Immunantwort der Soforttypallergie**

Der Weg vom Allergenkontakt bis hin zur allergischen Reaktion wird durch verschiedene Mediatoren und Zelltypen gesteuert. Bei der Typ-I-Reaktion nehmen insbesondere die Antikörper eine zentrale Rolle als Vermittler der erworbenen humoralen Immunantwort ein.

Bei Antikörpern handelt es sich um heterodimere Proteine, die zuerst 1890 von Behring und Kitasato beschrieben wurden (Behring & Kitasato, 1965). Sie hatten eine Struktur im Blut gefunden, die das Diphtherie-Toxin neutralisieren konnte. In diesem Zeitraum wurde das Antigen noch als „Antisomatogen und Immunkörperbildner“ beschrieben. Viele Jahre und Forschungsbemühungen später veröffentlichten Tiselius und Kabat 1939 weitere Erkenntnisse über die Igs und ihre Struktur, die zur ersten Einteilung der Ig-Klassen führte (Schroeder & Cavacini, 2010).

Antikörper werden je nach Art des konstanten Teils ihrer schweren Kette in fünf Klassen eingeteilt. Zu den Ig-Klassen, die auch als Isotyp bezeichnet werden, gehören IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Im Folgenden werden IgE und IgG

vorgestellt, da diese im Kontext der Insektengiftallergie sehr relevant sind und einen wichtigen Aspekt dieser Arbeit darstellen.

### **1.5.1 Immunglobulin E**

IgE spielt eine wichtige Rolle bei der Immunreaktion gegen Parasiten und Wurminfektionen. In Industrieländern, in denen Wurmerkrankungen kaum oder gar nicht mehr vorkommen, vermittelt IgE hauptsächlich allergische Soforttypreaktionen. Wie bereits in Kap. 1.3 beschrieben, ist die Typ-I-Reaktion durch IgE-Antikörper auf Effektorzellen, die sich bei Allergenkontakt quervernetzen und zur Degranulation der Effektorzelle mit Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren führen, gekennzeichnet. IgE wurde bereits in den 60er Jahren entdeckt. Damals war es noch als „Reagin“ bekannt (Ishizaka et al., 1966; Johansson & Bennich, 1967) und galt bereits zu dieser Zeit als eines der Schlüsselmoleküle der allergischen Sofortreaktion. IgE besitzt von allen Antikörperklassen die geringste Serumhalbwertszeit (ca. 3 Tage) und bildet außerdem von den Isotypen den kleinsten Anteil des Gesamtantikörpervorkommens. So ist beispielsweise die Konzentration von freiem IgE im Serum im Vergleich zu IgG  $10^4$ -fach niedriger (Gould & Sutton, 2008). Ein Großteil des IgE liegt allerdings, insbesondere durch die Bindung an hochaffine IgE-Rezeptoren auf Effektorzellen, in zellgebundener Form vor. So ist auch die hohe biologische Aktivität trotz sehr geringer Serumkonzentrationen zu erklären.

Bei der Insektengiftallergie ist die Th2- und IgE-Antwort auf das spezifische Antigen begrenzt. Die Gesamtkonzentration des IgE im Serum ist, im Gegensatz zu beispielsweise der Pollenallergie, bei betroffenen Patienten nicht erhöht. Insektengiftallergiker sind keine typischen Atopiker und haben somit keine erhöhte Bereitschaft an Asthma bronchiale, atopischem Ekzem oder der allergischen Rhinokonjunktivitis zu leiden (Akdis et al., 2004).

### **1.5.2 Immunglobulin G**

IgG bildet mit 70-75% den quantitativ größten Teil der Gesamtimmunglobulinmenge des menschlichen Körpers (Gould & Sutton, 2008). Antikörper dieser Klasse nehmen eine beträchtliche Rolle hinsichtlich der Toleranzentwicklung bezüglich des entsprechenden Allergens ein und sind seit

vielen Jahren Gegenstand der Forschung. Von allen Antikörperklassen besitzt IgG mit ca. 21 Tagen die längste Serumhalbwertszeit (Schroeder & Cavacini, 2010).

IgG liegt beim Menschen in vier Subklassen vor (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), die sich über ihre schweren Ketten definieren (Natvig & Kunkel, 1973; Vollmar, 2012). Die Subklassenverteilung bei nicht-allergischen Kontrollen ist von IgG1 mit 70% dominiert, IgG2 macht 20%, IgG3 6% aus und IgG4 bildet mit etwa 4% den kleinsten Anteil (Natvig & Kunkel, 1973). Bei allergischen Patienten unter SIT ist die Verteilung dieser Subklassen von Antikörpern, die gegen das relevante Allergen gerichtet sind, zugunsten von IgG1 und IgG4 verschoben (Aalberse et al., 2009).

IgG4-Antikörpern werden neutralisierende Eigenschaften zugeschrieben. Sie binden an Fcγ-Rezeptoren auf bspw. Monozyten, Makrophagen oder Lymphozyten mit niedriger Affinität, aktivieren kein Komplement und unterbinden außerdem die IgG1-vermittelte Komplementaktivierung (Wisniewski et al., 2013). IgG4-Antikörper sind aufgrund ihrer bivalenten Struktur nicht in der Lage, identische Antigene zu binden. Dies führt zu einer Reduktion der Antigen-Antikörper Komplexe durch geringere Quervernetzung und führt somit zur Abschwächung der allergischen Reaktion (Aalberse et al., 2009; Schroeder & Cavacini, 2010). IgG4-Antikörper werden auch als blockierende Antikörper bezeichnet, da sie mit dem spezifischen IgE um die Bindung an Effektorzellen und das Allergen konkurrieren. Die Expression von IgG4 durch B-Zellen scheint direkt oder indirekt durch die IL-10-Sekretion regulatorischer T-Zellen (Tregs) verstärkt zu sein (Jeannin et al., 1998; Jutel et al., 2013).

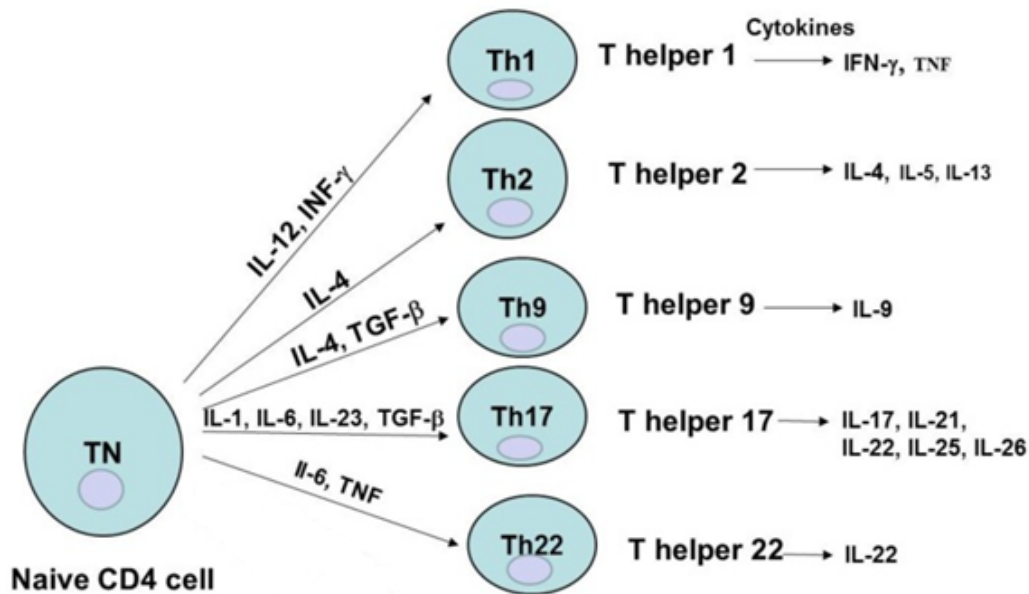
## **1.6 T-Zellen im Kontext der Soforttypallergie**

Im Rahmen der adaptiven Immunantwort nehmen T-Zellen auf zellulärer Ebene der Soforttypallergie eine wichtige Rolle ein. Je nach T-Zellpopulation können diese Zellen sowohl zu einer Begünstigung der allergischen Reaktion als auch zur Toleranzentwicklung gegenüber dem entsprechenden Allergen führen. Die T-Zellen lassen sich in unterschiedliche Subpopulationen unterscheiden, deren

relevanten T-Zellsubgruppen im Zusammenhang mit der Insektengiftallergie im Folgenden näher vorgestellt werden.

### 1.6.1 T-Helfer-Zellen

Naive T-Zellen können u.a. in Th1-, Th2-, Th9-, Th17- und Th22-Zellen differenzieren, die alle den Th-Zellen zugeordnet werden (Abb. 2).



**Abb.2:** Differenzierung von T-Zellen zu verschiedenen CD4<sup>+</sup> T-Zellsubpopulationen: Die Ausreifung der naiven T-Zelle zu verschiedenen Subpopulationen erfolgt nach Antigenpräsentation durch bspw. DZ. Verschiedene Zytokine und weitere Kofaktoren im Mikromilieu, welche von DZ und andere Zellen sezerniert werden, induzieren die Differenzierung der naiven T-Zelle durch die Aktivierung bestimmter Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren (Golubovskaya & Wu, 2016).

#### 1.6.1.1 T-Helfer 2-Zellen

IgE-vermittelte, allergische Erkrankungen werden durch eine gesteigerte Immunantwort gegenüber für den menschlichen Organismus harmlosen Allergenen verursacht. Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, nehmen die Th2-Zellen innerhalb dieser gesteigerten Immunantwort eine wichtige Rolle ein. Durch die Expression von Th2-Zellen aus naiven T-Zellen kommt es wiederum zur Inhibition von IL-10 -und Interferon(IFN) $\gamma$ -produzierenden Zellen. Sie sezernieren IL-4, IL-5 sowie IL-13 und bewirken u.a. die IgE-Antikörperantwort, eine Mastzelldegranulation und Eosinophilenaktivierung (Romagnani, 2004).

Die Differenzierung zu Th2-Zellen geschieht unter dem Einfluss von IL-4, welches nach Interaktion mit dem IL-4 Rezeptor und dessen Bindung an GATA-3 (GATA-bindendes Protein 3 (Zhu et al., 2003)) zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT6 (*signal transducer and activator of transcription-6*) führt. IL-4 hemmt die Th1-Antwort durch Inhibition der T-bet-Expression und Unterdrückung der Th1-Differenzierung auf Stimulation durch IL-2 und IFN $\gamma$ . GATA-3, induziert durch IL-4, bindet an den Promotor FOXP3 und hemmt somit die FOXP3-Expression. Dies führt wiederum zu einer Reduktion regulatorischer T-Zellen (Treg). Somit scheint GATA-3 über diesen Mechanismus eine Allergentoleranz zu verhindern (Mantel et al., 2007).

### **1.6.1.2 T-Helfer 1-Zellen**

Th1-Zellen sind charakterisiert durch die vorherrschende Produktion von IL-12, IFN $\gamma$  und Tumornekrosefaktor(TNF)- $\beta$ . Diese Zytokine spielen u.a. eine wichtige Rolle in der Makrophagenaktivierung und der Typ-IV-Reaktion (Romagnani, 2004).

Die Differenzierung von Th1-Zellen wird durch IL-12 und IFN $\gamma$ , welches von DZs sezerniert wird, vermittelt. IL-12 bindet an den IL-12-Rezeptor auf naiven T-Zellen und führt zusammen mit IFN $\gamma$  zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT4. STAT1 stimuliert die Expression des T-Box Transkriptionsfaktors (T-bet). Dieser gilt als wichtigster Transkriptionsfaktor für die Differenzierung der Th1-Zellen (Soyer et al., 2013). Zusammen mit RUNX3 induziert T-bet wiederum die IFN $\gamma$ -Produktion, Repression des IL-4-Gens und die Hemmung von GATA-3 (Djuretic et al., 2007). T-bet und RUNX3 verhindern somit die Th2-Zelldifferenzierung auf transkriptioneller Ebene.

### **1.6.1.3 T-Helfer 2/T-Helfer 1-Modell**

Ein gestörtes Gleichgewicht zwischen allergenspezifischen Th1- und Th2-Zellen wurde schon seit vielen Jahren als Ursache für das Auftreten verschiedener Allergien angesehen. So zeigten Atopiker bereits in früher Kindheit ein zugunsten des Th2-Phänotyps und der Th2-Zell-assoziierten Zytokine verschobenes Zellbild (Akkoc et al., 2011; Romagnani, 2004). Eine von Th1-Zellen geprägte Immunantwort wurde eher im Zusammenhang mit

Autoimmunerkrankungen und allergischen Spättypreaktionen (Typ IV nach Coombs und Gell) beobachtet (Ozdemir et al., 2011).

Dieses Modell bzw. die Ausbildung einer Th1-Th2-Balance unter SIT wurde auch zunächst als Erklärungsansatz für die Induktion einer Toleranz unter SIT angesehen. Nach der Entdeckung der Tregs rückten diese allerdings vermehrt in den Fokus der Forschung (Ozdemir et al., 2011).

### **1.6.2 Regulatorische T-Zellen**

Jahrzehnte lang forschten Wissenschaftler hauptsächlich an der Aufdeckung der Mechanismen, die eine Immunantwort induzieren. Die Selbsttoleranz ist jedoch auch von der Kontrolle oder Abschaltung von Immunantworten abhängig. Bereits 1972 beschrieben Gershon et al. die Existenz von T-Zellen mit suppressiver Aktivität (Gershon et al., 1972). Diese Zellen wurden als „Suppressorzellen“ bezeichnet. Aufgrund fehlender Möglichkeiten, diese Suppressor-Zellen genauer zu charakterisieren, wurde das Konzept kritisch betrachtet und rückte zunächst in den Hintergrund. Erst in den 90er Jahren wurden die Suppressor-Zellen, nun „regulatorische T-Zellen“ genannt, wieder zum Objekt intensiver Forschung und sind dies bis heute geblieben. In den letzten Jahren gab es immer mehr Belege, dass Tregs einen essentiellen Bestandteil in der Suppression Th2-vermittelter Entzündung sowie in der Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung der immunologischen Toleranz darstellen (Akdis, 2009).

Tregs besitzen die Fähigkeit sowohl körpereigene als auch körperfremde Antigene zu erkennen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Autoimmunkrankheiten, allergischen Erkrankungen, der Tumorentwicklung, Infektionen und der fetomaternalen Toleranz während der Schwangerschaft. So wurde beispielsweise gezeigt, dass bei Patienten mit schwerem refraktärem Asthma  $CD4^+CD25^+$  Tregs im peripheren Blut vermindert sind, während Exazerbationen fiel die Zahl der  $CD4^+CD25^+$  Tregs weiter, ebenso die IL-10-Genexpression (Mamessier et al., 2008). Dennoch gibt es auch Studien, die zeigen, dass Patienten mit mittelschwerem Asthma in der bronchoalveolären Lavage einen höheren Anteil an  $CD4^+Foxp3^+$  Tregs im Vergleich zu Patienten mit mildem Asthma oder gesunden Kontrollen haben (Smyth et al., 2010).

Allergiker und Nicht-Allergiker besitzen allergenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die unter Allergenstimulation in vitro proliferieren (Mittag et al., 2010). Auch Tregs werden durch diesen Stimulus induziert, allerdings ist selbige Induktion bei Allergikern reduziert. Eine mögliche Erklärung für diesen Zustand ist die Herunterregulation von Foxp3 durch von Th2-Zellen vermittelte Zytokine, insbesondere IL-4 (Mantel et al., 2007). Bei gesunden Individuen führt die wiederholte Exposition mit einem Allergen zur Induktion von peripherer (außerhalb des Thymus und des Knochenmarks auftretender) Toleranz. Studien mit Imkern, die während der Imkersaison wiederholt gestochen wurden, zeigten einen Switch des T-Zellprofils von Th1- und Th2-Zellen zu IL-10 sezernierenden Typ-1-regulatorischen T-Zellen (Tr1-Zellen). Gleichzeitig mit der Herunterregulation der allgenspezifischen T-Zellantwort nahmen auch die T-Zell-vermittelten Spätphasereaktionen (Schwellung in der Umgebung der Stichstelle) der Haut ab. Die T-Zellregulierung hält so lange wie die Allergenexposition an, nach Ende der Imkersaison erreichten die T-Zellprofile innerhalb von 2-3 Monaten wieder ihre Ausgangswerte (Meiler et al., 2008).

Tregs sind in der Lage direkt oder indirekt Effektorzellen der allergischen Reaktion, wie z.B. Mastzellen, Eosinophile und Basophile, zu supprimieren (Ozdemir et al., 2009; Palomares et al., 2010). Sie modulieren die Antikörperproduktion, hemmen die IgE-Produktion und verstärken gleichzeitig die Produktion von Antikörpern wie IgG4 und IgA (Akdis et al., 1998). Ein weiterer Beitrag der Tregs zur spezifischen Immunsuppression und Toleranzinduktion besteht in der Hemmung der Reifung der DZ und der Aktivierung naiver zu antigenreaktiven T-Zellen (Onishi et al., 2008).

Tregs-Zellen werden in verschiedenen Subpopulationen unterteilt. Ihre phänotypischen und funktionellen Abgrenzungen sind jedoch noch nicht ganz klar definiert.

### **1.6.2.1 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs**

Aktuell lassen sich Treg-Zellen in zwei Kategorien einteilen: Natürlich vorkommende Tregs (nTreg) und induzierbare Tregs (iTreg). Während des normalen Prozesses der T-Zellreifung im Thymus kommt es zur Differenzierung der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nTregs. Diese CD4<sup>+</sup>-Zellen exprimieren konstitutiv den

Aktivierungsmarker CD25<sup>+</sup> (alpha-Kette des IL-2-Rezeptors) und bilden einen Anteil von 5-10% der gesamten peripheren CD4<sup>+</sup>-Zellen (Baecher-Allan et al., 2001). Diese Zellpopulation exprimiert den Transkriptionsfaktor Foxp3, welcher auch heute noch als ihr spezifischster Marker gilt (Dasgupta & Saxena, 2012). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass der Expression von Foxp3 eine essentielle Rolle bei einer Reihe von Immunprozessen zukommt. So führte die *loss of function*-Mutation des Foxp3-Gens in *scurfy* Mäusen zur Verhinderung der Ausbildung von nTregs. Dies induzierte das Auftreten von lymphoproliferativen Erkrankungen, gesteigerten IgE-Konzentrationen und Eosinophilie und endete innerhalb von 3 Wochen letal (Brunkow et al., 2001; Ozdemir et al., 2009).

Neben den im Thymus ausgebildeten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> nTregs gibt es eine weitere Gruppe an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Zellen, die erst in der Peripherie entsteht. Diese Zellen leiten sich von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> T-Zellen ab und sind phänotypisch nicht von den nTregs aus dem Thymus zu unterscheiden. Es gibt Studien, die zeigen, dass die Differenzierung aus den o.g. Zellen zum Beispiel unter TGF-β Stimulation induziert werden kann (Chen et al., 2003).

Die iTregs erlangen ihre supprimierende Fähigkeit durch die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen infolge spezifischer Stimulationsbedingungen. Zu den antigenspezifischen iTregs gehören bspw. die IL-10-produzierenden Tr1-Zellen (Toda & Piccirillo, 2006).

### **1.6.2.2 Typ-1-regulatorische T-Zellen**

Tr1-Zellen gehören zu der Population der CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> iTregs und sind durch eine hohe Syntheserate ihres Markerzytokins IL-10 gekennzeichnet. IL-10 werden immunsuppressive Eigenschaften zugeordnet. Es nimmt eine entscheidende Rolle in der peripheren Toleranzentwicklung gegenüber Allergenen, Auto-, Tumor- und Transplantationsantigenen ein. Zu den immunregulatorischen Eigenschaften gehört u.a. die Hemmung der Proliferation und Differenzierung anderer T-Zellpopulationen (=Effektor-T-Zellen), beispielsweise durch die direkte Inhibition von IL-2 und TNF-α (Pestka et al., 2004; Shevach, 2009). Weitere Charakteristika bestehen in der Inhibition der DZ-Reifung und Reduktion der Ausschüttung inflammatorischer Zytokine durch



Mastzellen. Eine Erhöhung der IL-10 Produktion führt außerdem zur spezifischen Anergie in peripheren T-Zellen (Akdis et al., 1998).

Auf humoraler Ebene konnte gezeigt werden, dass IL-10 den Klassenwechsel zu IgE verhindert und somit die Produktion von IgG-Antikörpern begünstigt. Insbesondere die Herstellung des Subtyps IgG4 wird durch IL-10 augmentiert (Jutel et al., 2006b). Ferner kann durch die Hemmung von IL-5 die Heranreifung von B-Zellen sowie die Aktivierung von Eosinophilen unterbunden werden (Schandene et al., 1994). Aus diesen Eigenschaften lässt sich ableiten, dass IL-10 sowohl über humorale als auch zelluläre Mechanismen immunologische Toleranz induzieren kann.

Neben den hier erwähnten Klassen der Tregs scheint es noch eine größere Vielzahl zu geben (Peterson, 2012), deren Klassifikation aktuell diskutiert und erforscht, aber auf die in dieser Arbeit nicht näher eingegangen wird.

## **1.7 Therapieformen der Insektengiftallergie**

### **1.7.1 Therapie der akuten Reaktion**

#### **1.7.1.1 Gesteigerte Lokalreaktion**

Bei einer gesteigerten Lokalreaktion auf einen Insektenstich erfolgt die Therapie mit einem stark wirksamen topischen Glukokortikoid und ggf. einem oralen Antihistaminikum. Des Weiteren können kühlende, feuchte Umschläge angewandt werden (Przybilla et al., 2011).

Bei ausgeprägten Beschwerden steht als zusätzliche Therapieoption eine orale kurzfristige systemische Glukokortikoidtherapie zur Verfügung. Hier sind Dosierungen von 0,5-1mg Prednisolonäquivalent/kg KG angezeigt. Stichreaktionen, die sich im Kopf- oder Halsbereich abspielen, sollten zusätzlich nachbeobachtet werden, damit eine schnelle Intervention bei möglicher Verlegung der Atemwege möglich ist (Przybilla et al., 2011).

### **1.7.1.2 Systemische Reaktion**

Zur Behandlung anaphylaktischer Reaktionen liegen Leitlinien vor (Ring et al., 2014). Die Therapie wird auf den klinischen Befund abgestimmt und durchgeführt.

#### **1.7.1.2.1 Allgemeine Maßnahmen**

Als erste Maßnahme muss die sofortige Beendigung der Zufuhr des mutmaßlichen Auslösers unterbrochen werden, ggf. durch Anlage eines Tourniquets mit Unterbrechung des arteriellen Bluteinstroms und des venösen Abstroms. Des Weiteren ist der Patient flach oder in Trendelenburg-Position zu lagern. Ein großlumiger intravenöser Zugang ist zu legen und eine Rachen- und Kehlkopfspiegelung sollte bei klinischem Verdacht auf Larynxödem frühzeitig erfolgen. Bei einem ausgeprägten Larynxödem muss ggf. eine Koniotomie oder Nottracheotomie durchgeführt werden, um eine ausreichende Oxygenierung aufrechtzuerhalten. Manifeste kardiovaskuläre oder pulmonale Reaktionen können die Applikation von Sauerstoff bis hin zur endotrachealen Beatmung erfordern.

#### **1.7.1.2.2 Medikamentöse Therapie**

Folgende Medikamente haben sich zur Behandlung der Insektengiftanaphylaxie bewährt: Katecholamine (v.a. Adrenalin), Antihistaminika, Glukokortikoide, Sauerstoff und Medikamente zur Volumensubstitution (z.B. Elektrolytlösungen, Plasmaersatzmittel). Welches Medikament zum Einsatz kommt und in welcher Darreichungsform es zu applizieren ist, entscheidet sich anhand der klinischen Symptome und entsprechend dem Schweregrad der Anaphylaxie. Jedem Insektengiftallergiker wird nach Diagnosestellung ein Notfallset, welches ein Antihistaminikum, ein Kortikosteroid und Adrenalin beinhaltet, verschrieben (Przybilla et al., 2011).

### **1.7.2 Langfristige Therapie**

#### **1.7.2.1 Allergenkarrenz**

Die strikte Einhaltung einer Allergenkarrenz gestaltet sich bei der Insektengiftallergie schwierig. Allerdings gibt es Verhaltensregeln, die dazu

dienen, Insektenstichen vorzubeugen und diese weitestgehend zu vermeiden (vgl. Tab. 6).

**Tab. 6:** Verhaltensregeln zur Vermeidung eines Insektenstichs (modifiziert nach Przybilla et al., 2011)

---

### **Verhaltensregeln zur Vermeidung eines Insektenstichs**

---

1. Repellentien bieten keinen Schutz
  2. Verzehr von Speisen und Getränken sowie Obst- und Blumenpflücken im Freien vermeiden
  3. Nicht in der Nähe von Abfallbehältern/Tiergehegen aufhalten
  4. Kein Parfum oder parfümierte Externa verwenden
  5. Nach dem Essen Hände waschen und Mund abwischen
  6. Nicht aus Flaschen oder Dosen trinken, stets Trinkhalme verwenden
  7. Insekten nicht mit hektischen Bewegungen verscheuchen
  8. Die Haut durch Kleidung weitgehend bedeckt halten, nicht Barfuß oder mit offenem Schuhwerk laufen
  9. Wohnungsfenster durch Insektennetze sichern
  10. Auf versteckte Insekten (Schuh, Bett) achten
  11. Bienenstöcke/Wespennester in naher Umgebung des ständigen Aufenthaltsortes ggf. entfernen lassen
- 

### **1.7.2.2 Selbsthilfemaßnahmen des Patienten bei erneutem Stich**

Damit im Falle eines Stichs direkt Handlungsmöglichkeiten bestehen, sollten dem Patienten Medikamente verschrieben werden, die er immer mit sich zu führen hat (Notfallset, vgl. 1.7.1.2.2). Wichtig ist, dass die Patienten das Notfallset stets mit sich führen, über die korrekte Anwendung informiert sind und die einzelnen Medikamente regelmäßig auf Haltbarkeit überprüft und ggf. ersetzt werden. Außerdem bieten sich die Erstellung und Ausgabe von Patientenmerkblätter zum „Verhalten bei neuerlichem Stich“ an (Przybilla et al., 2011).

### **1.7.2.3 (Allergen-) spezifische Immuntherapie (SIT)**

#### **1.7.2.3.1 Klinische Aspekte der SIT**

Die SIT, die unter anderem auch als Hyposensibilisierung oder Allergenimmuntherapie bezeichnet wird, wurde erstmalig 1911 von Leonard Noon und John Freeman für die Behandlung der allergischen Rhinokonjunktivitis angewandt (Noon, 1911). Für die Therapie der Insektengiftallergie wurde die SIT bereits in den 1920-30er Jahren des letzten Jahrhunderts etabliert. Den Patienten wurden Ganzkörperinsektenextrakte über einen langen Zeitraum in steigender Dosis appliziert, um damit eine Abschwächung des Grads der Allergie zu erreichen (Bousquet et al., 1998). Bis zu den 1970er Jahren wurden Ganzkörperinsektenextrakte benutzt. Dieses Vorgehen wurde aufgrund einer placebokontrollierten Studie, die zeigte, dass aufgereinigte Hg-Extrakte sowohl den Ganzkörperinsektenextrakten als auch Placebopräparaten überlegen sind, zugunsten der Hg-Extrakte verlassen (Hunt et al., 1978).

Noch heute - mehr als 100 Jahre nach ihrer Einführung - gilt die SIT weiterhin als einzige Therapie IgE-vermittelter allergischer Erkrankungen mit kausalem und präventivem Ansatz.

#### **1.7.2.3.2 Indikation und Kontraindikation für die SIT**

Zur Indikationsstellung für die Einleitung der SIT wurde nach den Empfehlungen der *European Academy of Allergy and Clinical Immunology* (EAACI) ein Algorithmus erstellt (Bonifazi et al., 2005). Eine SIT sollte erfolgen bei Patienten mit Bienen- oder Wespengiftanaphylaxie vom Schweregrad  $\geq$  II nach Ring und Meßmer sowie bei Patienten, die lediglich eine Grad-I-Reaktion hatten, bei denen allerdings zusätzliche Risikofaktoren für erneute und/oder schwere Stichreaktionen vorliegen oder eine Einschränkung der Lebensqualität durch die Insektengiftallergie besteht. Zusätzlich zu den o.g. Kriterien sollte eine Sensibilisierung auf das reaktionsauslösende Gift im Hauttest und/oder im Serum nachgewiesen worden sein. Bei fehlendem Nachweis einer Sensibilisierung sind ggf. Zusatztests (z.B. Basophilenaktivierungstest, BAT) erforderlich (Przybilla et al., 2011).

Bei den Kontraindikationen werden temporäre und dauerhafte unterschieden. Zu den temporären Kontraindikationen zählen u.a. grippale Infekte, unzureichend eingestelltes Asthma, Impfungen mit Infektionserregern sowie eine mangelhafte Compliance des Patienten. Dauerhafte Kontraindikationen sind bei der SIT mit Insektengift weniger streng als bei der SIT mit Aeroallergenen zu stellen, da es sich bei der Insektengiftanaphylaxie um ein potenziell lebensbedrohliches Krankheitsbild handelt. Bei schweren kardiovaskulären, malignen neoplastischen und Immunerkrankungen muss eine individuelle Nutzen-Risiko-Abwägung stattfinden. Einige Medikamente stellen eine relative Kontraindikation zur SIT dar, dazu gehören Betablocker und ACE-Hemmer. Wenn möglich, sollten diese Medikamente eine Woche vor Beginn der SIT abgesetzt und durch andere Wirkstoffe ersetzt werden. Früher noch sehr streng gesehen, relativierte sich dies in den letzten Jahren. Bei Betablockern bspw. ist ein Wechsel auf einen kardioselektiven Betablocker empfohlen. Ist dies aufgrund einer absoluten Indikation für den jeweiligen Betablocker nicht möglich, muss die Steigerungsphase unter ständiger Überwachung stattfinden (Przybilla et al., 2011).

### **1.7.2.3.3 Durchführung der SIT**

Es stehen mehrere Protokolle im Rahmen der SIT zur Verfügung. Diese unterscheiden sich insbesondere in der Dauer der Steigerungsphase bis zum Erreichen der Erhaltungsdosis von 100µg Hg/Injektion (Bonifazi et al., 2005). In Deutschland werden vorwiegend Ultra-Rush- oder Rush-Protokolle verwendet, bei denen die Erhaltungsdosis nach 2-7 Tagen erreicht wird (Kleine-Tebbe et al., 2009). Rush- und Ultra-Rush-Protokolle bieten den Vorteil einer schnell eintretenden Schutzwirkung. Deshalb sind diese Protokolle insbesondere bei stark gefährdeten Patienten oder auch zu Beginn der Insektenflugsaison indiziert (Kleine-Tebbe et al., 2009). Angewendet werden in der Steigerungsphase wässrige Extrakte. Ab Erreichen der Erhaltungsdosis wird üblicherweise auf ein an Aluminiumhydroxid adsorbiertes Depotpräparat umgestiegen. Die Therapie kann ab diesem Zeitpunkt ambulant durchgeführt werden. Die Erhaltungsdosis wird alle 4-6 Wochen verabreicht (Przybilla et al., 2011). Eine Erhaltungsdosis von 200µg Hg/Injektion wird bei Patienten mit einem besonderen Expositionsrisiko, einem erhöhten Risiko für schwere

Anaphylaxien oder nach nicht vertragener Stichprovokation (vgl. 1.7.2.3.4) empfohlen.

### **1.7.2.3.4 Therapiedauer der SIT**

Die Therapiedauer und die Parameter, an denen ein Beenden der Therapie fixiert werden kann, werden teilweise kontrovers diskutiert. Es wird beschrieben, dass nach Absetzen der SIT in 8-15% der Fälle die Schutzwirkung innerhalb von 5-10 Jahren verloren geht (Golden et al., 2000). Ein bleibender Schutz ist nur durch Dauertherapie zu erwarten. Laut aktueller Leitlinie kann aber die Therapie beendet werden, wenn die Erhaltungstherapiedauer 3-5 Jahre betrug, nach den Injektionen keine systemischen anaphylaktischen Reaktionen auftraten und der Stich des ursächlichen Insektes (bevorzugt durch ärztlich überprüfte Stichprovokation) zu keiner systemischen Reaktion führte (Müller et al., 1993). Falls die letzten zwei Bedingungen nicht erfüllt sind, wird empfohlen die Therapie solange weiterzuführen, bis ein negativer Hauttest und ein Verlust der spezifischen IgE-Antikörper gegen das allergieauslösende Insekt zu verzeichnen ist. Patienten mit einem besonderen Expositionsrisiko sollen nach Leitlinien die Therapie bis zu dem Zeitpunkt fortführen, an dem kein erhöhtes Expositionsrisiko mehr besteht (Przybilla et al., 2011). Eine lebenslange Therapie wird Patienten mit Mastozytose, einer Anamnese für Stichreaktionen des Schweregrads IV nach Ring und Messmer oder anderen außergewöhnlich hohen Risiken empfohlen (Przybilla et al., 2011).

### **Stichprovokation und Verlaufskontrolle**

Aktuell existiert noch kein Labortest, der einen eindeutigen Schutz vor zukünftigen systemischen Stichreaktionen vorhersagen kann. Lediglich mithilfe der Stichprovokation können definitive Aussagen über das Therapieversagen gemacht werden. Die Stichprovokation sollte möglichst 6-12 Monate nach Erreichen der Erhaltungsdosis durchgeführt werden (Przybilla et al., 2011). Nach Abschluss der Therapie ist eine routinemäßige Stichprovokation zur Verlaufskontrolle kontraindiziert, da diese Reexposition zu einer Resensibilisierung führen kann (Lerch & Muller, 1998; Ruëff et al., 1996). Bei einer systemischen Reaktion sollte eine Steigerung und Fortführung der Therapie mit einer Erhaltungsdosis von 200µg Hg/Injektion erfolgen.

Auch nach Beendigung der Therapie, ist der Patient zu instruieren, Maßnahmen zur Vermeidung von Stichen weiterhin einzuhalten und ein Notfallset mit sich zu führen. Eine erneute anaphylaktische Reaktion nach Bienen- oder Wespenstich (nach Therapieabschluss) macht eine erneute Diagnostik und ggf. wiederholte SIT erforderlich (Przybilla et al., 2011).

### **Wirkprinzipien**

Bereits seit Jahrzehnten stehen die Mechanismen der peripheren Toleranzinduktion durch die SIT im Fokus vieler allergologischer und immunologischer Forschungsbemühungen. Die SIT stellt einen kurativen Therapieansatz dar und scheint über eine differenzierte immunologische Modulation der Pathomechanismen der allergischen Soforttypreaktion zu wirken. Mittlerweile gelten verschiedene durch die SIT induzierte Veränderungen im Immunsystem als ursächlich für den Erfolg der Therapie. Diese treten zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der SIT auf.

Bereits zu Beginn der SIT kommt es zur Induktion einer (vorerst noch passageren) Toleranz und somit geringerer Ausschüttung von Mediatoren durch Mastzellen und basophile Granulozyten nach Hg-Exposition (Eberlein-König et al., 1995; Plewako et al., 2006). Es folgt die Generierung allergenspezifischer Tregs und Bregs und die damit verbundene IL-10 vermittelte Suppression allergenspezifischer Effektor-T-Zellpopulationen (Th1 und Th2 (Akdis & Akdis, 2015)).

Verschiedene Veränderungen auf humoraler Ebene sind im Verlauf der SIT zu beobachten. Es ist häufig ein initialer Anstieg des spezifischen IgE zu detektieren, im weiteren Verlauf kann das IgE dann auf Werte unterhalb des Ausgangsniveaus vor Beginn der SIT abfallen (Bousquet et al., 1986; Gleich et al., 1982; Van Ree et al., 1997). Dieser potentielle Abfall des spezifischen IgE kann allerdings nicht allein als Ursache der Wirkung der SIT herangezogen werden, da er relativ gering ist, erst im Verlauf auftritt und nur wenig mit der klinischen Symptomatik korreliert. Aus diesen Gründen wurde ein Anstieg der spezifischen IgG4-Antikörper als Surrogatmarker für das klinische Ansprechen der SIT diskutiert. Dieser ist bereits wenige Tage nach Einleitung der SIT zu

beobachten und setzt sich bis zum Ende der Therapie kontinuierlich fort (Akdis & Akdis, 2015).



## 2 Material

### 2.1 Patientenmaterial

|          |  |
|----------|--|
| Vollblut | Patienten der Klinik für<br>Dermatologie und Allergologie des<br>Uniklinikums Gießen und Marburg<br>GmbH, Standort Marburg (UKGM<br>Marburg) |
|----------|--|

### 2.2 Lösungen und Zusätze für die Kultivierung humaner Zellen

|   |                              |
|---|------------------------------|
| Fötales Kälberserum (FCS)   | Biochrom GmbH, Berlin        |
| Humanes Serum (PMS)   | PAA Laboratories GmbH, Cölbe |
| L-Glutamin 200mM mit Penicillin<br>(10.000U/ml)/Streptomycin(10.000µg/ml) | PAA Laboratories GmbH, Cölbe |
| RPMI 1640 Medium, ohne L-Glutamin   | PAA Laboratories GmbH, Cölbe |

### 2.3 Zytokine und Proteinantigene

|                      |                                     |
|----------------------|-------------------------------------|
| Interleukin-2, human | Roche diagnostics GmbH,<br>Mannheim |
| Interleukin-7, human | Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach  |
| PLA2                 | Latoxan, Valence, Frankreich        |

### 2.4 Chemikalien

|  |   |
|--|---|
| 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC;<br>$C_{14}H_{14}N_2$ ) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH,<br>Schnelldorf |
| Ammoniumchlorid ( $NH_4Cl$ )                         | Mallinckrodt Baker, Griesheim             |
| Dimethylsulfoxid (DMSO; $C_2H_6OS$ )                 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH,<br>Schnelldorf |
| Dulbecco's PBS 1x (ohne $Ca^{2+}$ und<br>$Mg^{2+}$ ) | PAA Laboratories GmbH, Cölbe              |

## Material

|  |   |
|--|---|
| Essigsäure (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> )   | Merck KGaA, Darmstadt                     |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA;<br>C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH,<br>Schnelldorf |
| FACSClean  | Becton Dickinson GmbH,<br>Heidelberg      |
| FACSFlow   | Becton Dickinson GmbH,<br>Heidelberg      |
| FACSRinse  | Becton Dickinson GmbH,<br>Heidelberg      |
| Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )  | Merck KGaA, Darmstadt                     |
| Natriumacetat  | Merck KGaA, Darmstadt                     |
| Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )  | Merck KGaA, Darmstadt                     |
| N,N-Dimethylformamid (DMF; C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO)                                       | Merck KGaA, Darmstadt                     |
| Pancoll, human   | PAN-Biotech GmbH, Aidenbach               |
| 2-Propanol (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O)   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH,<br>Schnelldorf |
| Rinderalbumin Fraktion V (BSA)   | Carl Roth GmbH + Co. KG,<br>Karlsruhe     |
| Trypanblau-Lösung 0,4%   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH,<br>Schnelldorf |
| Tween 20   | Merck KGaA, Darmstadt                     |
| Wasserstoffperoxid 30% (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )  | Merck KGaA, Darmstadt                     |

## 2.5 Puffer und Medien

| <u>Puffer/Medium</u> | <u>Zusammensetzung</u>  |
|----------------------|---|
| ACK-Lysis Puffer     | 0,15M NH <sub>4</sub> Cl<br>+ 1mM KHCO <sub>3</sub><br>+ 0,1mM EDTA<br>auf 1l ddH <sub>2</sub> O<br>pH 7,2 - 7,4 einstellen |

## Material

|                |  |
|----------------|--|
| FACS-Puffer    | Dulbecco's PBS 1x<br>+ 1% BSA<br>+ 0,1% NaN <sub>3</sub><br>Sterilfiltration mittels Stericup 0,22µm<br>Lagerung bei 4°C |
| Einfriermedium | FCS + 10% DMSO   |
| RPMI++         | RPMI 1640<br>+ 100U/ml Penicillin<br>+ 100µg/ml Streptomycin<br>+ 2mM L-Glutamin   |

## 2.6 Antikörper für durchflusszytometrische Analysen

| Spezifität | Klon           | Isotyp          | Konjugat | Hersteller                           |
|------------|----------------|-----------------|----------|--------------------------------------|
| CD4        | RPA-T4         | Maus IgG1,<br>k | FITC     | Becton Dickinson GmbH,<br>Heidelberg |
| CD25       | M-A251         | Maus IgG1,<br>k | APC      | Becton Dickinson GmbH,<br>Heidelberg |
| CD127      | hIL-7R-<br>M21 | Maus IgG1,<br>k | PE       | Becton Dickinson GmbH,<br>Heidelberg |
| Iso-K      | MOPC-21        | Maus IgG1,<br>k | FITC     | Becton Dickinson GmbH,<br>Heidelberg |
| Iso-K      | MOPC-21        | Maus IgG1,<br>k | APC      | Becton Dickinson GmbH,<br>Heidelberg |
| Iso-K      | MOPC-21        | Maus IgG1,<br>k | PE       | Becton Dickinson GmbH,<br>Heidelberg |

## 2.7 Kommerzielle Tests für die serologische und zelluläre Diagnostik

|  |                                   |
|--|-----------------------------------|
| BD ELISPOT Human IL-5 Elispot Set          | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg |
| BD ELISPOT Human IL-10 Elispot Set         | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg |
| BD ELISPOT Human IFN- $\gamma$ Elispot Set | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg |

## 2.8 Verbrauchsartikel

|   |  |
|---|--|
| 48-well (Loch)-Platten, steril                        | Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden                      |
| 96-well Elispotplatten, steril                        | Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden                      |
| Combitips 5ml, steril/unsterile                       | Eppendorf, Hamburg                                 |
| Deckgläschen für Neubauer<br>Zählkammer               | Menzel GmbH & Co. KG,<br>Braunschweig              |
| Einweg-Pipetten 1ml, 5ml, 10ml, 25ml,<br>50ml, steril | Sarstedt, Nümbrecht                                |
| Einfrier-Röhrchen 2ml, steril                         | Greiner, Frickenhausen                             |
| FACS-Röhrchen (Polystyren-Röhrchen<br>5ml)            | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg                  |
| Monovette (CPDA)                                      | Sarstedt, Nümbrecht                                |
| Monovette (Serum-Gel)                                 | Sarstedt, Nümbrecht                                |
| Pasteurpipetten Glas                                  | Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.<br>KG, Eberstadt |
| Pipettenspitzen                                       | Kalensee, Gießen                                   |
| Stericup  | Millipore  |
| Zentrifugen-Röhrchen 15ml, 50ml                       | Greiner, Frickenhausen                             |

## 2.9 Geräte

|  |  |
|--|--|
| Analysenwaage 770                            | Gottl. Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern             |
| Auflicht-Mikroskop Axiostar                  | Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen                |
| CO <sub>2</sub> -Inkubator HERAcell 150      | Heraeus Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold |
| Durchflusszytometer FACSCalibur              | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg                      |
| Einfrierbehälter Qualifreeze                 | Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden                          |
| ELISPOT Scanner Eli.Scan                     | A.EL.VIS, Hannover                                     |
| ImmunoCap 100€                               | Phadia AB, Uppsala, Schweden                           |
| Kühlzentrifuge Megafuge 1.0                  | Heraeus Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold |
| Magnetrührer IKAMAG RET                      | IKA Labortechnik, Staufen                              |
| Mehrkanalpipette Discovery 20-200µl          | ABIMED, Langenfeld                                     |
| Multipette plus                              | Eppendorf, Hamburg                                     |
| Neubauer Zählkammer                          | Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen       |
| pH-Meter CyberScan pH 510                    | Eutech Instruments Europe bv, Nijkerk, Niederlande     |
| Pipettierhilfe BD Falcon Express             | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg                      |
| Pipetten Research 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl | Eppendorf, Hamburg                                     |
| Präzisionswaage 440-49N                      | Gottl. Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern             |
| Reagenz-Reservoir                            | Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden                          |
| Sterilbank HERAsafe                          | Heraeus Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold |
| Stickstofftank Chronos 200                   | Cryotherm GmbH & Co. KG, Kirchen                       |
| Vortexmixer IKA Genius 3                     | IKA Labortechnik, Staufen                              |

## **2.10 Software**

|                  |                                   |
|------------------|-----------------------------------|
| BD CellQuest Pro | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg |
| Microsoft Excel  | Microsoft, USA                    |
| Microsoft Word   | Microsoft, USA                    |
| Endnote X6       | Thompson Reuters, USA             |
| GraphPad Prism   | GraphPad Software, USA            |

### 3 Methoden

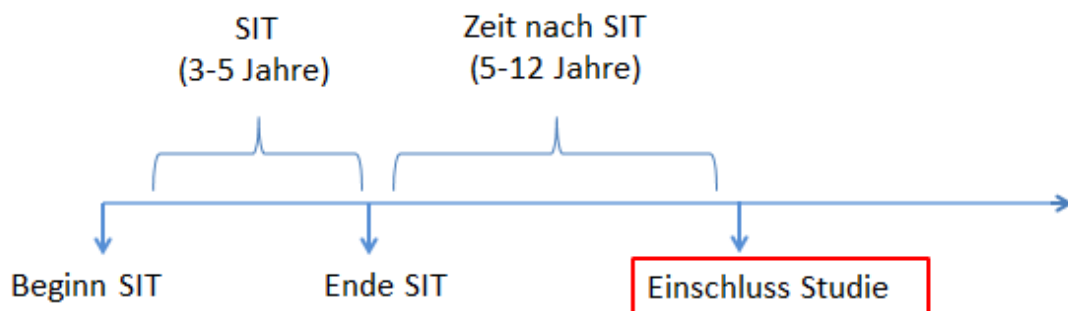
#### 3.1 Patienten

In der vorliegenden Studie wurde ein Kollektiv von 61 Insektengiftallergikern (13 Bienen-, 40 Wespen-, 7 sowohl Bienen- und Wespen-, 1 Hornissengiftallergiker) inkludiert. Hiervon waren 31 Patienten weiblich. Es lag eine Altersspanne von 22 – 76 Jahren vor, das Durchschnittsalter betrug 60 Jahre zum Zeitpunkt des Patienteneinschlusses.

Als Kontrollpopulation fungierten acht gesunde Probanden, bei denen keine Manifestation einer IgE-vermittelten Allergie bekannt war. Hiervon war die Hälfte der Patienten weiblich, das Durchschnittsalter 30 Jahre (Spannweite 22-54 Jahre).

#### 3.2 Studiendesign

Im Rahmen der Studie wurden Insektengiftallergiker, die vor 5 oder mehr Jahren eine SIT mit Bienen- und/oder Wespengift abgeschlossen hatten, untersucht. Bei den Allergikern handelt es sich um Patienten der Klinik für Dermatologie und Allergologie des UKGM Marburg. Die Patienten wurden abhängig vom Beendigungsjahr der SIT in Gruppen eingeteilt.



**Abb. 3: Darstellung des Patientenkollektivs im zeitlichen Zusammenhang.** Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Patientenkollektiv, welches eine SIT mit Bienen- und/oder Wespengift vor 5-12 Jahren abgeschlossen hatte. Die Therapiedauer betrug 3-5 Jahre.

Abhängig vom Zeitpunkt des Therapiebeginns und den damals aktuell gültigen Leitlinienempfehlungen (Przybilla et al., 2011) haben sich die Patienten der Hyposensibilisierung mit dem entsprechenden Allergen 3-5 Jahre unterzogen. Vier Patienten konnten keine sichere Aussage mehr über das Beendigungsjahr machen. Fünf Patienten hatten die Therapie aus verschiedenen Gründen (z.B. Umzug, mangelnde Compliance) vorzeitig abgebrochen.

Um ähnlich große Kollektive und somit statistisch auswertbare Ergebnisse zu erhalten, wurden die Patienten in mehrere Gruppen aufgeteilt. Therapieabbrecher und die Patienten, die keine genaue Aussage über das Beendigungsjahr treffen konnten, wurden aus der Studie ausgeschlossen. Die Patienten 4-6 Jahre nach Abschluss der SIT werden im Folgenden als  $\leq 6$  Jahre zusammengefasst, analog werden die Patienten 11-13 Jahre nach SIT als  $\geq 11$  Jahre bezeichnet (Tab. 8).

**Tab. 7:** Zusammenfassung der Patienten zu unterschiedlichen Kollektiven

| Jahre nach Therapieende | $\leq 6$ | 7+8 | 9+10 | $\geq 11$ | Kontrollen |
|-------------------------|----------|-----|------|-----------|------------|
| n                       | 14       | 8   | 17   | 13        | 8          |

Die Patienten wurden in der Allergieambulanz der Klinik für Dermatologie des UKGM Marburg zunächst über die Studie aufgeklärt, für alle durchgeführten Untersuchungen lag ein positives Ethikvotum durch die Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg vor. Nach Beantwortung etwaiger Fragen erfolgte die schriftliche Einwilligung durch die Patienten. Es folgten eine Blutabnahme für die experimentelle Evaluation, eine Befragung zur Lebensqualität, Stichereignissen und Reaktionen nach der Therapie sowie Hauttests (vgl. 3.3.1.1 und 3.3.1.2).

### 3.3 Klinische Evaluation

Die klinische Evaluation und die Durchführung der im Folgenden in 3.3 beschriebenen Verfahren fand in der Allergieambulanz der Klinik für Dermatologie und Allergologie des UKGM Marburg statt. Das Patientenkollektiv wurde im Rahmen von 2 Studien evaluiert. In der einen Studie wurden Daten



zur Lebensqualität analysiert. Die hier vorliegende Arbeit untersuchte humorale und zelluläre immunologische Parameter.

Da diese Arbeit auf einige der Ergebnisse der anderen Studie Bezug nimmt, werden auch die Methoden der klinischen Evaluation neben den Methoden der experimentellen Evaluation vorgestellt.

### **3.3.1 Hauttests**

Voraussetzung für einen auswertbaren Prick –oder Intrakutantest ist das regelrechte Ergebnis der Positiv- und Negativkontrolle (siehe 3.3.1.1.) – bei der Negativkontrolle darf es keine Hautreaktion geben, während diese bei der Positivkontrolle zwingend notwendig ist. Verfälschende Faktoren sind u.a. die Einnahme verschiedener Medikamente, insbesondere Antihistaminika, Steroide und einiger Antidepressiva. Die Patienten wurden bereits im Vorfeld der Blutentnahme darauf hingewiesen und gebeten, entsprechende Medikamente (falls möglich) rechtzeitig abzusetzen. Zum Zeitpunkt der Testung wurde die aktuelle Medikation erneut abgefragt und dokumentiert.

#### **3.3.1.1 Pricktest**

Bei dem Hautpricktest wurden den Patienten maximal drei Konzentrationen (1/10/100µg/ml) des Bienen– und Wespengifts in steigender Dosierung in die volare Seite des Unterarms eingestochen.

Die am schwächsten konzentrierte Allergenlösung (Konzentration 1µg/ml) wurde gleichzeitig mit der Positivkontrolle (Histamin) und der Negativkontrolle (Kochsalzlösung) auf verschiedene Stellen des Unterarms getropft und anschließend mit jeweils einer Pricklancette in die Epidermis eingestochen, ohne dass ein Blutaustritt hervorgerufen wurde.

Nach 15min erfolgte nun die semiquantitative Beurteilung der Hautreaktion. Hier wurde auf Quaddel- und Erythembildung sowie die zugehörigen Durchmesser geachtet (Ruëff et al., 2011). Ab einer Quaddelbildung von 3mm Durchmesser wird der Pricktest als positiv gewertet. Bei einer Reaktion wurde der Pricktest beendet, spätestens jedoch nach der höchsten Konzentration (100µg/ml).

### **3.3.1.2 Intrakutantest**

Wenn im Pricktest bei der stärksten Allgenkonzentration keine Hautreaktion auftrat, wurde der Intrakutantest in drei aufeinanderfolgenden Konzentrationsstärken (0,01/0,1/1µg/ml) am anderen Unterarm durchgeführt. Auch hier wurde mit der geringsten Konzentration (0,01µg/ml) begonnen, die Allergenlösung wurde über eine Spritzenkanüle streng intradermal injiziert. Ab einer Quaddelbildung von 5mm Durchmesser wird der Intrakutantest als positiv gewertet. Nach 15min erfolgte die Begutachtung, bei positiver Reaktion die Beendigung, ansonsten die weitere Testung mit den nächsthöheren Allergenkonzentrationen (0,1µg/ml bzw. 1µg/ml).

## **3.4 Serologische Diagnostik**

Nach Zentrifugation (3.000rpm, 10min, 4°C) des Vollbluts wurde das Serum abpipettiert und bei -20°C eingefroren. Nach Abschluss der Rekrutierung wurden die Proben für die serologische Diagnostik verwendet.

Aus dem Patientenserum wurde das Gesamt-IgE (Gesamtmenge der im peripheren Blut zirkulierenden IgE-Antikörper) mit Hilfe des ImmunoCap Systems nach Herstellerangaben (Thermo Fisher, Freiburg) bestimmt. Zudem wurden die IgE-Antikörper gegen spezifische Majorallergene des Bienen- (Api m 1) und Wespengifts (Ves v 1 und Ves v 5) bei allen Patienten gemessen. Analog wurden außerdem die Bienen- und Wespengift spezifischen IgG- und IgG4-Antikörper bestimmt.

## **3.5 Zelluläre Diagnostik**

### **3.5.1 Zellseparation mittels Dichtegradienten-Zentrifugation**

Aus dem mit dem Antikoagulanzen CPDA (Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenosin) versetzten Patientenblut wurden für den folgenden Elispot (siehe 3.5.5) PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) mit Hilfe der Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert.

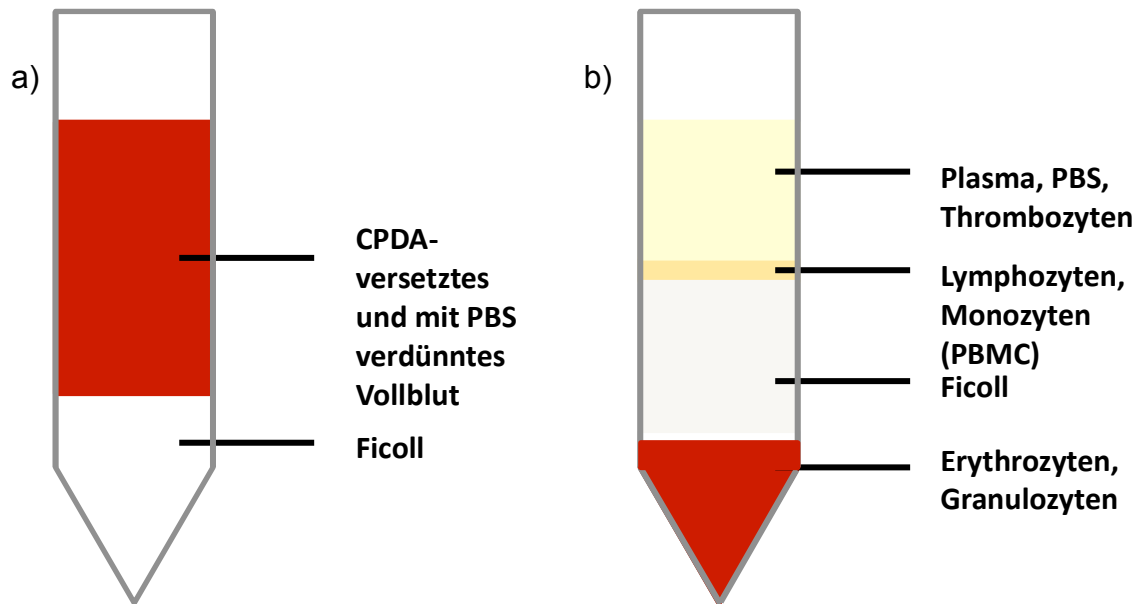
Für die Aufreinigung humaner PBMCs wurden Ficoll-Trennlösungen eingesetzt. Diese nutzen die Eigenschaften des hydrophilen Zuckerpolymers Ficoll. Mit dem Ficoll wird eine wässrige Lösung mit der Dichte von 1,077g/ml hergestellt. Das mit PBS im Verhältnis 2:1 gemischte CPDA-Blut wird auf die Ficoll-Lösung geschichtet. Während der anschließenden Zentrifugation kommt es zur Aggregation der Erythrozyten (Dichte: 1,100g/cm) und folglich zu deren Sedimentation. Des Weiteren setzen sich Granulozyten ab (Dichte: 1,079-1,092g/cm) und bilden nun mit den Erythrozyten die unterste Schicht des Zentrifugenröhrchens.

Aufgrund ihrer geringeren Dichte im Vergleich zu der Ficoll-Lösung bilden Lymphozyten (1,070g/cm), Monozyten (1,065g/cm) und Thrombozyten (1,058g/cm) eine konzentrierte Schicht zwischen der zuunterst liegenden Ficoll-Lösung und dem Plasma.

### Durchführung:

Das CPDA-Blut der Patienten wurde spätestens 5h nach Abnahme bei 1.300rpm (20°C, 10min) zentrifugiert. Das Plasma wurde abpipettiert und bei -20°C eingefroren. Die zellulären Bestandteile wurden mit PBS im Verhältnis 2:1 verdünnt, anschließend auf die in 50ml Röhrchen vorgelegte Ficoll-Lösung (15ml) langsam geschichtet und daraufhin bei 1.500rpm (20°C, 30min) mit Deaktivierung der Bremse zentrifugiert. Durch diese Dichtegradientenzentrifugation trennen sich die einzelnen Schichten (vgl. Abb.4).

Die PBMC-Schicht wurde vorsichtig abpipettiert, in ein neues 50ml Röhrchen, in dem bereits 15ml gekühltes (4°C) PBS vorgelegt waren, gegeben und mit PBS auf 50ml aufgefüllt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (1.800rpm, 4°C, 10min) wurde der Überstand dekantiert und verworfen. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 50ml PBS (1.300rpm, 4°C, 10min). Anschließend wurden die pelletierten PBMCs in RPMI<sup>++</sup> aufgenommen und die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt (vgl. 3.5.2).



**Abb. 4:** Klassisches Verteilungsmuster vor (a) und nach (b) Dichtegradientenzentrifugation

### 3.5.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Anzahl vitaler PBMCs innerhalb der Zellsuspension wurde die Neubauer-Zählkammer genutzt: 15µl Zellsuspension wurden mit 15µl einer 0,4% Trypanblau-Lösung verdünnt und in die mit einem Deckglas verschlossene Neubauer-Zählkammer gegeben. Bei Trypanblau handelt es sich um einen polyanionischen Diazofarbstoff, der zur Unterscheidung von vitalen Zellen mit intakter Zellmembran und toten Zellen mit perforierter Zellmembran dient. Da er die intakte Zellmembran nicht passieren kann, färbt er folglich nur bei toten Zellen die zytosolischen Proteine dunkelblau an. Nach der Vitalfärbung wurde nun mit Hilfe des Lichtmikroskops die Konzentration der lebenden Zellen ermittelt: 2 Großquadrate (jedes ergibt durch eine Fläche von 1mm<sup>2</sup> und einer Tiefe von 0,1mm ein Volumen von 0,1µl) der Zählkammer wurden ausgezählt und mit folgender Formel wurde die Anzahl der lebenden Zellen/ml in der gesamten Zellsuspension bestimmt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Summe der gezählten Zellen} / 2 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

### 3.5.3 Kryokonservierung

Die in RPMI<sup>++</sup> aufgenommenen Zellen wurden bei 1.300rpm (4°C, 10min) zentrifugiert, der Überstand dekantiert und verworfen. Das Pellet wurde in Einfriermedium (FCS mit 10% DMSO, ca. 10<sup>6</sup> Zellen/ml) resuspendiert und in Einfrierröhrchen überführt. Eine schonende Herunterkühlung (1°C/min) auf -80°C wurde mittels spezieller mit 2-Propanol befüllten Behälter gewährleistet. Nach zwei Tagen im -80°C Gefrierschrank wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und dort bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 3.5.4 Auftauen der Zellen

Zum Auftauen der kryokonservierten Zellen wurden die Einfrierröhrchen in ein 37°C Wasserbad gestellt, es folgte ein Waschschrift mit RPMI<sup>++</sup> (1.300rpm, 4°C, 10min) und die anschließende Kultivierung (siehe 3.5.5).

### 3.5.5 Frequenzanalyse allergenspezifischer Zellen mittels Elispot

Bei dem Elispot handelt es sich um ein Verfahren zum Nachweis von sezernierten Zytokinen, die von (Immun-) Zellen nach Stimulation produziert werden, wodurch die quantitative Detektion dieser Immunzellen möglich ist.

In dem vorliegenden Fall wurde zu den Zellen ein Antigen hinzugegeben, so dass die hierdurch stimulierten antigenspezifischen Zellen in der folgenden 2-24h dauernden Sekretionsphase bestimmte Zytokine freisetzen. Diese werden durch einen monoklonalen *capture*-Antikörper an einer festen Phase (hier: hydrophobe Immobilon-P (Polyvinylidenfluorid; PVDF)-Membran) gebunden. Anschließend werden die Zellen durch mehrere Waschschriffe entfernt und ein biotinylierter Detektionsantikörper hinzugegeben. Dieser bindet ein weiteres Epitop des jeweiligen ausgeschütteten Zytokins. Der Detektionsantikörper geht nun eine Wechselwirkung mit dem nachfolgend zugegebenen und enzymgekoppelten Konjugat ein. Nach Zugabe eines Substrats kommt es durch eine kolorimetrische Reaktion zur Entwicklung eines Farbniederschlags (Spot) an der Stelle, an dem das Zytokin an den *capture*-Antikörper gebunden hat.

Die Anzahl der Spots wird durch ein Bildanalysegerät detektiert und korreliert mit der Frequenz der zytokinsezernierenden Zellen.

### Durchführung:

Die kryokonservierten PBMCs wurden aufgetaut und in einer Konzentration von  $10^6$  Zellen/ml in Kulturmedium (RPMI<sup>++</sup> + 10% PHS) auf eine 48-*well* Platte gegeben. Neben einer unstimulierten Negativkontrolle wurden die Zellen mit 0,1/1/2,5 µg/ml Api m 1 stimuliert und inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Nach zwei Tagen wurden die Zytokine IL-2 und IL-7 den Zellkulturen hinzugefügt, um die Api m 1-spezifischen T-Zellen zu expandieren.

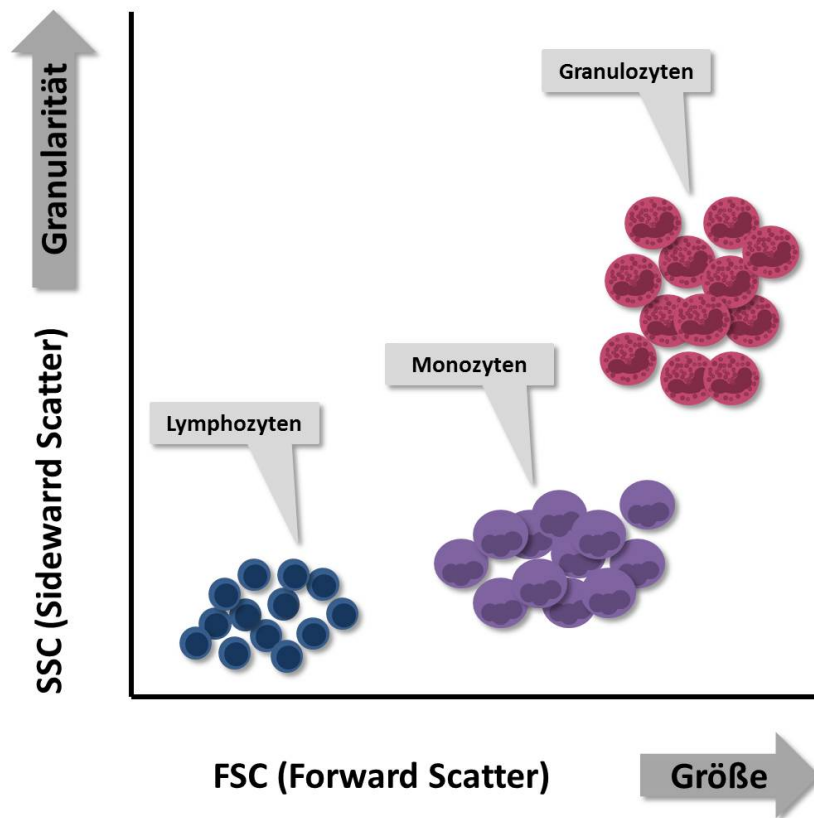
An Tag 7 wurden die Membranen der Elispotplatten mit anti-humanem IFN $\gamma$ , IL-5 oder IL-10 monoklonalen Antikörpern beschichtet und über Nacht bei 4°C gelagert. An Tag 8 wurden die Zellen erneut mit Api m 1 in den drei oben genannten Konzentrationen sowie unspezifisch mit anti-CD3-AK und anti-CD3/CD28 *Beads* restimuliert. Dafür wurden die Zellen vorsichtig aus den 48-*well* Platten abpipettiert, zentrifugiert und in RPMI<sup>++</sup> + 10% PHS aufgenommen.

Auf die beschichteten Membranen der Elispotplatte wurden je 100 µl des Kulturmediums (+/- Antigen) und anschließend 100 µl der Zellsuspension gegeben. Es folgte eine erneute Inkubationsphase von 20h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Anschließend wurde der Elispotassay wie folgt nach Herstellerangaben durchgeführt: Detektionsantikörper, Enzym-Konjugat und Substratreagenz wurden hinzugegeben. Nach Entwicklung der Spots wurden diese mittels eines automatischen Bildanalysegeräts detektiert und gezählt. Die Frequenz der Api m 1-spezifischen Zellen ergab sich aus dem Median der Triplikate der jeweiligen Probe. Die Anzahl der Spots in der unstimulierten Probe wurden von denen der stimulierten Probe subtrahiert und so die Frequenz der Antigen-spezifischen Zellen errechnet.

### **3.5.6 Durchflusszytometrie**

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) ist es möglich, Zellsuspensionen bezüglich bestimmter zellulärer Eigenschaften wie Größe, Granularität, Oberflächenantigenen oder intrazellulären Bestandteile zu charakterisieren. Die in einer Trägerflüssigkeit aufgenommenen Zellen passieren einzeln einen fokussierten Laserstrahl. Trifft der Laserstrahl auf eine Zelle entsteht Streulicht. Das Vorwärtstreulicht (*forward scatter*, FCS) ist ein Maß für die Lichtbeugung in Abhängigkeit von Zellgröße bzw. -volumen. Das

Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) ist ein Maß für die Brechung des Lichts. Diese ist abhängig von Granularität und Zellkernbeschaffenheit. Anhand dieser Parameter lässt sich die Zellsuspension im Hinblick auf Größe und Granularität darstellen (Abb. 5).



**Abb. 5: Schema eines Dot Plots nach durchflusszytometrischer Analyse:** Auftrennung der Zellen nach Größe (FSC) und Granularität (SSC)

Erythrozyten ähneln Lymphozyten hinsichtlich der Intensität des Streulichts. Sollte also eine Probe Erythrozyten und Lymphozyten enthalten, würde das Streulicht der Erythrozyten das Streulicht der Lymphozyten überlagern. Um diesem Effekt entgegenzuwirken, wurde das CPDA-Blut einer hypoosmolaren Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat (ACK)-Lyse unterzogen. Durch das entstehende Konzentrationsgefälle kommt es zum starken Flüssigkeitseinstrom, durch den die Erythrozytenmembran zerstört wird.

Des Weiteren ist es durch die Durchflusszytometrie möglich, Zellcharakteristika wie zum Beispiel Oberflächenantigene mit farbstoffgekoppelten Antikörpern zu detektieren. Durch den Laser angeregt wird fluoreszierendes Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert und vom Gerät in dem entsprechenden

Fluoreszenzkanal erfasst. So war es in der vorliegenden Studie möglich bis zu vier Farbstoffe zeitgleich zu detektieren. Es wurde ein Gerät benutzt, in dem ein Argon-Ionenlaser Zellen anregt, die mit Fluoreszenzmolekülen wie Phycoerythrin (PE) oder Isothiocyanat (FITC) markiert sind, und ein Diodenlaser mit Allophycocyanin (APC) markierte Zellen.

Für diese Studie war die Detektion der Oberflächenantigene CD4, CD25 und CD127 auf Lymphozyten bedeutend, da anhand der Expression dieser Oberflächenmarker für die Fragestellungen relevante Lymphozytensubgruppen charakterisiert werden konnten. Da anhand der FSC/SSC Darstellung die Lymphozytenpopulation von Monozyten und Granulozyten abgegrenzt werden konnte, war eine Lymphozyten-spezifische Analyse dieser Oberflächenantigene möglich.

### Durchführung:

Zu dem CPDA-Blut wurde im Verhältnis 1:10 ACK-Lysepuffer gegeben, 5min bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 1.200rpm (4°C, 8min) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und verworfen. Das Zellpellet wurde in der gleichen Menge ACK-Lysepuffer resuspendiert, abermals 5min dunkel bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend abzentrifugiert (1.200rpm, 4°C, 8min). Nach erneuter Dekantierung wurde das Zellpellet in RPMI<sup>++</sup> Medium gewaschen (1.200rpm, 4°C, 8min), sodann in 5ml FACS-Puffer resuspendiert und auf fünf Proben aufgeteilt. Die Röhrchen wurden nun bei 1.200rpm (4°C, 5min) zentrifugiert und der Überstand dekantiert und verworfen. Auf das Zellpellet wurden die für die durchflusszytometrischen Messungen benötigten Antikörper wie folgt gegeben:

### Probe:

- |   |  |
|---|--|
| 0 | hier handelt es sich um die ungefärbte Kontrolle, keine Zugabe von Antikörpern |
| 1 | (5µl) FITC Isotypkontrolle (1:50)  |
| 2 | (5µl) PE Isotypkontrolle (1:50)  |
| 3 | (5µl) APC Isotypkontrolle (1:50)   |



- 4                    (5µl) FITC CD4 (1:50)  
                      (5µl) APC CD25 (1:50)  
                      (2,5µl) PE CD127 (1:100)

Die Zellen wurden resuspendiert, auf Eis gestellt und für 20min bei Dunkelheit inkubiert. Anschließend folgten zwei Waschschr tte mit jeweils 1ml FACS-Puffer pro Probe (1.200rpm, 4°C, 5min). Nach dem zweiten Waschschr tt wurden 250µl FACS-Puffer zu jeder Probe gegeben und die Proben wurden bis zur Messung dunkel auf Eis gelagert.

### 3.6 Statistik

Die ermittelten Daten wurden aufgrund der nicht-parametrischen Verteilung als Mediane dargestellt, zur graphischen Veranschaulichung der ermittelten Einzelwerte wurden Punktdiagramme verwendet. Der Median ist als schwarzer Balken innerhalb der einzelnen Punkte repr sentiert.

F r den Vergleich ungepaarter Proben zu verschiedenen Zeitpunkten nach Abschluss der SIT untereinander sowie in Relation zu dem nicht-allergischen Kontrollkollektiv wurde der Mann-Whitney-U Test angewandt. Mit einem festgesetzten Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$  ergeben sich signifikante Unterschiede bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von  $p<0,05$ . Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Statistik- und Analyse-Software GraphPadPrism.

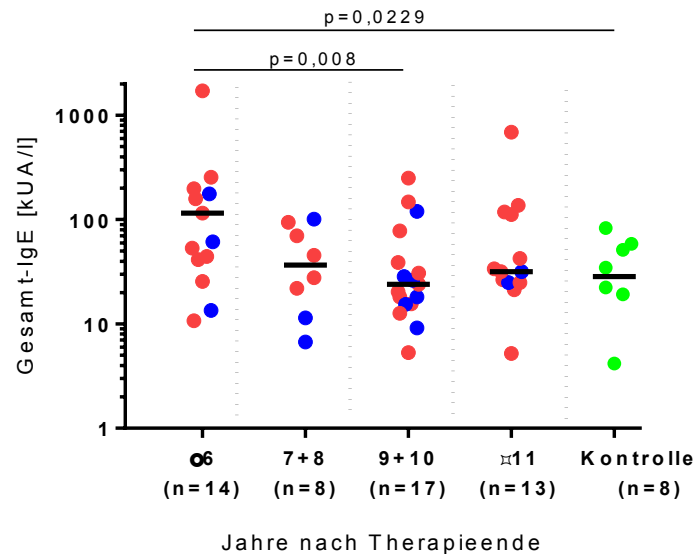
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Humorale Immunparameter nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie

Um die zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beendigung der SIT vorliegenden humoralen Parameter zu bestimmen, wurden die Gesamt-IgE- sowie die allergenspezifischen Antikörper-Konzentrationen aus dem Serum der Patienten mittels ImmunoCap bestimmt. Letztere beinhalten IgE-, IgG- und IgG4-Antikörper. Für Bienengiftallergiker sind im Folgenden spezifische IgE-Antikörper gegen Api m 1 und IgG- und IgG4-Antikörper gegen Bienengiftextrakt in blau (●) dargestellt. Die Werte der Wespengiftallergiker umfassen spezifische IgE-Antikörper gegen Ves v 1 und Ves v 5 (dargestellt ist der jeweils höhere Wert), die wie die IgG- und IgG4-Antikörper gegen Wespengiftextrakt farblich rot (●) dargestellt sind. Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren rekombinante Allergene lediglich für die spez. IgE-Antikörper verfügbar, nicht für die der IgG-Antikörper. Patienten, die eine SIT gegen Bienen- und Wespengift erhalten haben, sind mit jeweils zwei Werten repräsentiert.

#### 4.1.1 Gesamt-IgE

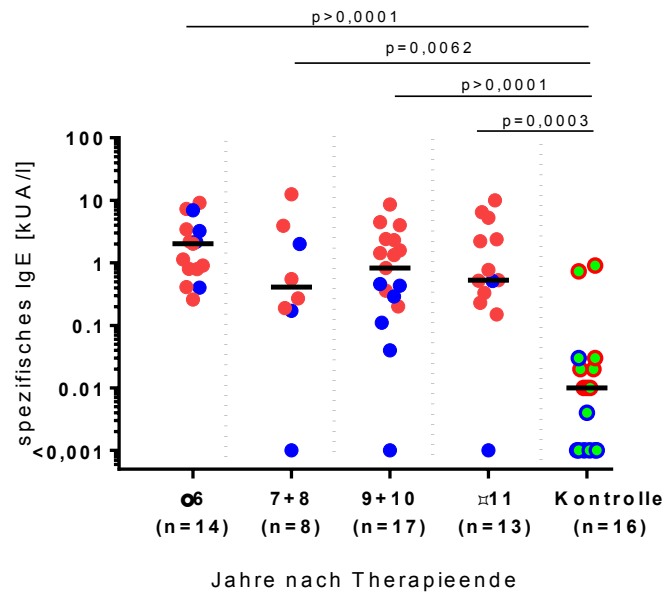
Die Konzentrationen des Gesamt-IgE befanden sich bei den verschiedenen Patientengruppen und dem nicht allergischen Kontrollkollektiv auf einem ähnlichen Niveau (Abb. 6). Lediglich Patienten, bei denen die Therapie vor sechs oder weniger Jahren abgeschlossen worden ist, wiesen gegenüber dem 9+10 Jahren nach Therapieende untersuchten Kollektiv sowie gegenüber den Kontrollprobanden signifikant höhere Gesamt-IgE-Konzentrationen auf.



**Abb. 6: Gesamt-IgE-Antikörperkonzentrationen nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT).** Dargestellt sind die Gesamt-IgE-Konzentrationen im Serum von Wespengift- (●) und Bienengiftallergikern (●). Das 9+10 Jahre nach SIT untersuchte Patientenkollektiv sowie gesunde Kontrollen zeigen signifikante Unterschiede zu den ≤6 Jahren nach SIT analysierten Patienten. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe (●) sind die Serumkonzentrationen des Gesamt-IgE der übrigen Patientenkollektive auf einem ähnlichen Level. Statistisch signifikante Veränderungen ( $p<0,05$ ) zwischen den Patientengruppen bzw. zu dem nicht-allergischen Kontrollkollektiv wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt.

#### 4.1.2 Spezifische IgE-Antikörper

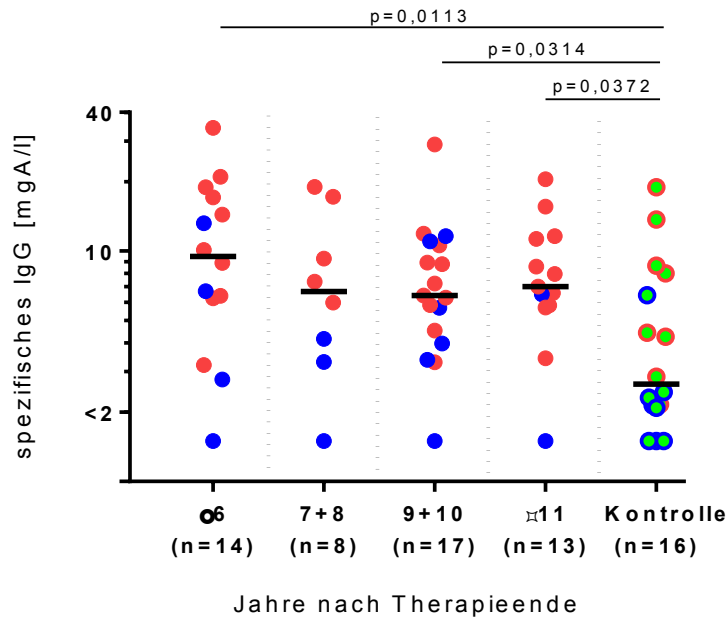
Die Konzentrationen der allergenspezifischen IgE-Antikörper aller Patientenkohorten lagen signifikant oberhalb der Werte der Kontrollen (Abb. 7). Zwischen den einzelnen Patientenkollektiven konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.



**Abb. 7: Allergenspezifische IgE-Antikörperkonzentrationen nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT).** Die Serumkonzentrationen der Bienengift (Api m 1) -spezifischen (●) und Wespengift (Ves v 1 bzw. Ves v 5 – dargestellt ist der jeweils höhere Wert) -spezifischen (●) IgE-Antikörper zeigten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach SIT keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Patientenkollektive. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe (● [Api m 1] und ● [Ves v 1 bzw. Ves v 5]) lagen die Serumkonzentrationen der spezifischen IgE-Antikörper der Patienten signifikant höher. Statistisch signifikante Veränderungen ( $p < 0,05$ ) wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt.

## 4.1.3 Spezifische IgG-Antikörperkonzentrationen

Des Weiteren wurden spezifische Antikörper des IgG-Isotyps gegen Bienen- und Wespengiftextrakt bestimmt. Im Vergleich zum Kontrollkollektiv zeigten sich bei den  $\leq 6$ , 9+10 sowie  $\geq 11$  Jahre nach Therapieende untersuchten Patientenkollektiven signifikant höhere Werte (Abb. 8). Zwischen den Patientengruppen ließen sich keine signifikanten Unterschiede ermitteln. Allerdings scheint es tendenziell eine Abnahme der Serumkonzentrationen der spezifischen IgG-Antikörper mit zunehmendem zeitlichem Abstand zur SIT zu geben.

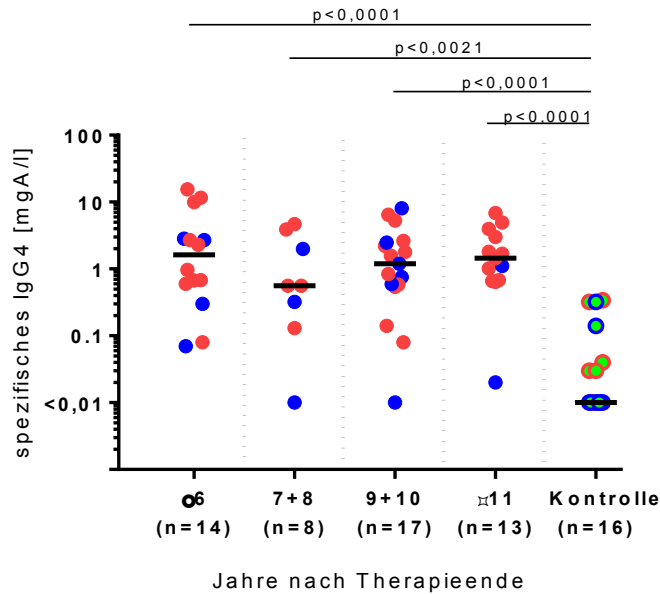


**Abb. 8: Allergenspezifische IgG-Antikörperkonzentrationen nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT).** Die Serumkonzentrationen der Bienengift- (●) und Wespengift-spezifischen (●) IgG-Antikörper zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach SIT untersuchten Patientenkollektiven. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe (● [Bienengift] und ● [Wespengift]) liegen die Serumkonzentrationen der spezifischen IgG-Antikörper der Patienten signifikant höher. Statistisch signifikante Veränderungen ( $p<0,05$ ) wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt.

#### 4.1.4 Spezifische IgG4-Antikörper

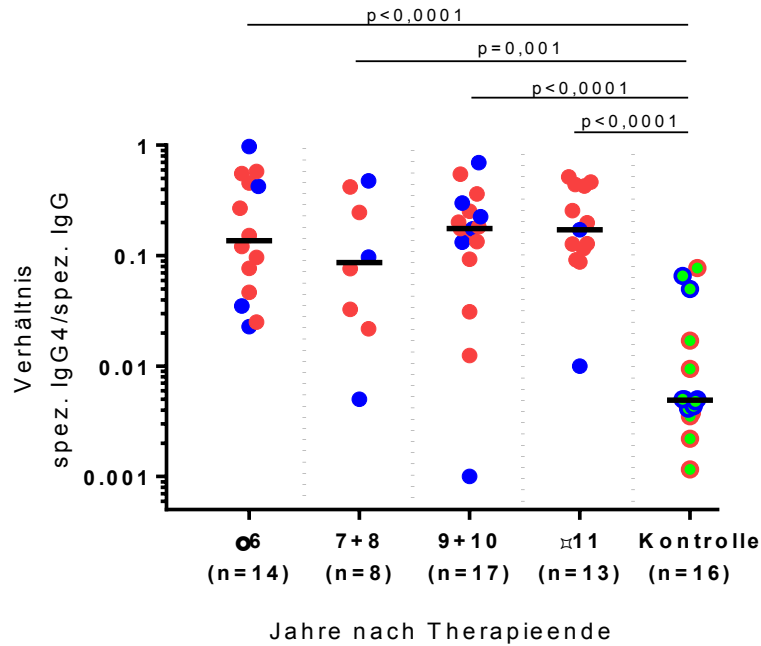
Des Weiteren wurden die antigenspezifischen Serumkonzentrationen des IgG-Subtyps IgG4 gemessen (insbesondere IgG4-Antikörpern werden protektive Eigenschaften zugeordnet und ein hoher IgG4/IgG Quotient wurde in der Literatur in der Vergangenheit als protektiv hinsichtlich Allergien beschrieben (Golden et al., 1982; Reisinger et al., 2005)).

Es zeigte sich, dass das Patientenkollektiv signifikant höhere spezifische IgG4-Antikörperkonzentrationen im Serum im Vergleich zu den nicht-allergischen Kontrollen aufweist (Abb. 9). Innerhalb des Patientenkollektivs ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen.



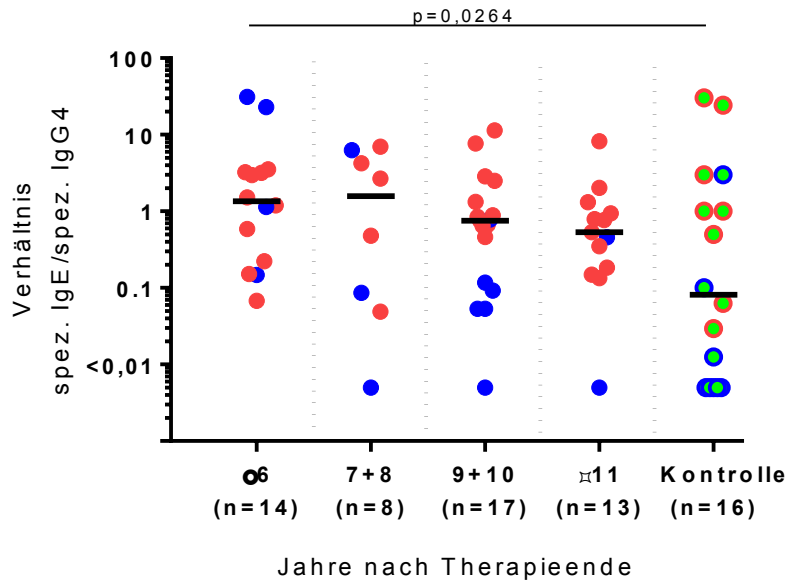
**Abb. 9: Allergenspezifische IgG4-Antikörperkonzentrationen nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT).** Die Serumkonzentrationen einzelner Patientenkollektive zeigten hinsichtlich ihrer Bienengift- (●) und Wespengift-spezifischen (●) IgG4-Antikörper keine signifikanten Unterschiede. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe (● [Bienengift] und ● [Wespengift]) waren die Serumkonzentrationen der allergenspezifischen IgG4-Antikörper bei den einzelnen Patientenkohorten jedoch signifikant höher. Statistisch signifikante Veränderungen ( $p < 0,05$ ) wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt.

Der Quotient aus allergenspezifischen IgG4- und IgG-Antikörpern zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen (Abb.10). Das allergenspezifische IgG der Patientenkollektive setzte sich anteilig aus signifikant mehr IgG4 zusammen als das spezifische IgG der Kontrollen, welches sich in einem signifikant höheren IgG4/IgG-Quotienten äußerte.



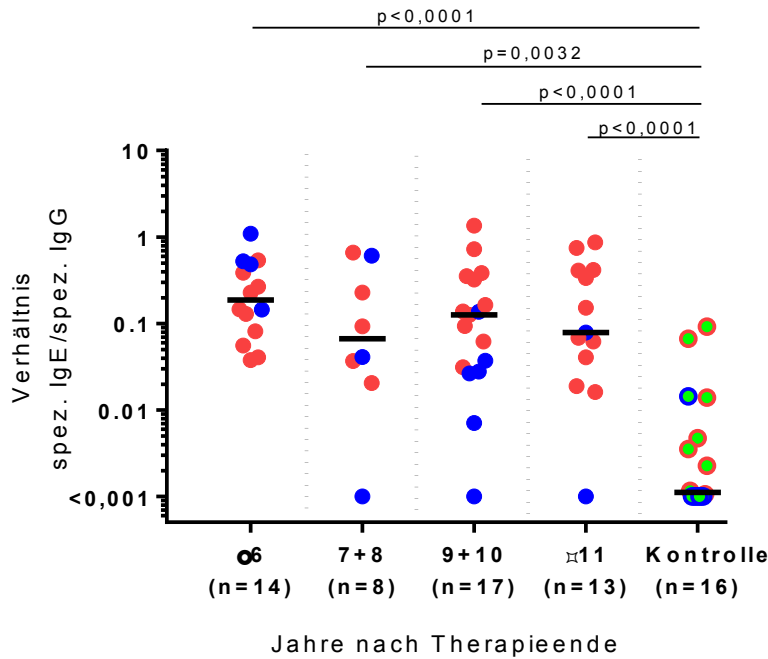
**Abb. 10: Das Verhältnis Bienen- bzw. Wespengift-spezifischer IgG4- zu IgG-Antikörper nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT).** Der IgG4/IgG-Quotient zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den zu unterschiedlichen Zeiten nach SIT untersuchten Patienten. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe war das IgG4/IgG-Verhältnis der Patientenkollektive deutlich zugunsten der allergenspezifischen IgG4-Antikörper verschoben. Statistisch signifikante Veränderungen ( $p < 0,05$ ) wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt.

Bei den Verhältnissen von allergenspezifischem IgE zu IgG4 bzw. zu IgG zeigten sich tendenziell ähnliche Ergebnisse (Abb. 11 und Abb. 12). Das  $\leq 6$  Jahre nach Therapieende untersuchte Patientenkollektiv wies ein im Vergleich zum Kontrollkollektiv signifikant zugunsten des IgE-Isotyps verschobenes Verhältnis auf. Die anderen Patientenkollektive zeigten analog einen tendenziell höheren IgE-Anteil. Innerhalb der Patientengruppen konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.



**Abb. 11: Das Verhältnis Bienengift- bzw. Wespengift-spezifischer IgE- zu IgG4-Antikörper nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT).** Die Patientenkollektive zeigten keine signifikanten Unterschiede ihrer IgE/IgG4-Quotienten. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe ist das IgE/IgG4-Verhältnis bei den Patienten deutlich zugunsten der allergenspezifischen IgE-Antikörper verschoben. Statistisch signifikante Veränderungen ( $p < 0,05$ ) wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt.





**Abb. 12: Das Verhältnis Bienengift- bzw. Wespengift-spezifischer IgE- zu IgG-Antikörper nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT).** Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede der IgE/IgG-Quotienten zwischen den einzelnen Patientenkollektiven. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe war bei den Patienten das IgE/IgG-Verhältnis deutlich zugunsten der spezifischen IgE-Antikörper verschoben. Statistisch signifikante Veränderungen ( $p < 0,05$ ) wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt.

## 4.2 Frequenzen Api m 1-spezifischer T-Zellpopulationen nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie

Neben den humoralen Faktoren wurden auch Parameter der zellulären Immunantwort zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beendigung der SIT untersucht. In diesem Zusammenhang wurde das Vorkommen und die Frequenz verschiedener allergenspezifischer T-Zellpopulationen bestimmt, um etwaige Veränderungen nach Abschluss der SIT in diesen Populationen zu ermitteln. Diese Untersuchungen wurden lediglich für das Kollektiv der Bienengiftallergiker durchgeführt, da zu dem Zeitpunkt der Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit als Allergen für die T-Zellstimulation nur Api m 1 zur Verfügung stand. Mit Hilfe des ELISPOT-Assays wurde nach

Stimulation mit Api m 1 die Anzahl der durch die Sekretion bestimmter „Markerzytokine“ charakterisierten T-Zellen quantitativ ermittelt.

Entsprechend der Sekretion von IFN $\gamma$ , IL-5 oder IL-10 wurden die Zellen Th1-, Th2- oder Tr1-Zellen zugeordnet (Abb. 13).

|                       | Kontrolle | Api m 1+<br>Api m 1 | Api m 1+<br>aCD3 | Api m 1+<br>aCD3/28 |
|-----------------------|-----------|---------------------|------------------|---------------------|
| IFN $\gamma$<br>(Th1) | 3 spots   | 2 spots             | 358 spots        | >500 spots          |
| IL-5<br>(Th2)         | 2 spots   | 1 spots             | 60 spots         | 127 spots           |
| IL-10<br>(Tr1)        | 3 spots   | 2 spots             | 10 spots         | 31 spots            |

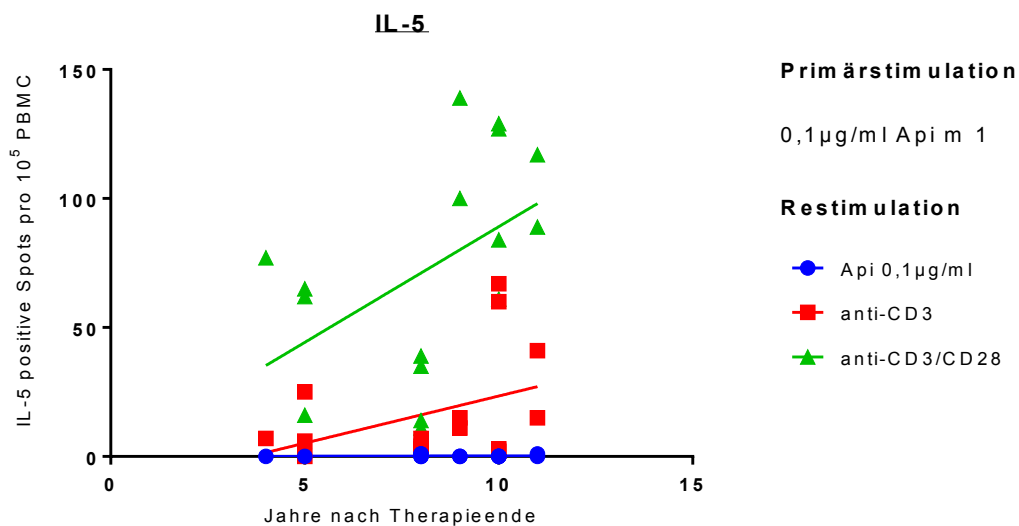
**Abb. 13: Die quantitative Bestimmung zytokinproduzierender Zellen mit Hilfe des ELISPOT-Verfahrens.** Veranschaulicht sind repräsentative Membranen mit unstimulierten (Kontrolle) oder Api m 1 +/- anti-CD3- bzw. anti-CD3/CD28-stimulierten PBMC. Jeder Punkt (Spot) stellt eine zytokinproduzierende Zelle dar, die entsprechend des sezernierten Zytokins (Interferon (IFN) $\gamma$ , Interleukin (IL)-5 bzw. IL-10) der jeweiligen T-Zellpopulation (T-Helfer (Th)1-Zellen, Th2-Zellen bzw. Typ-1-regulatorische T (Tr1)-Zellen) zugeordnet wurde. Zur Berechnung der Anzahl der Zellen, die eine spezifische Zytokinantwort auf Api m 1, anti-CD3 oder anti-CD3/CD28 zeigten, wurden die (unspezifischen) Spots der unstimulierten Kontrolle von den Spots der entsprechenden antigenstimulierten Proben subtrahiert. Die Ergebnisse geben die Anzahl an Spots pro 10<sup>5</sup> PBMC wieder.

Entsprechend der in Abb. 13 dargestellten Vorgehensweise wurde mit Hilfe des ELISPOT-Verfahrens die Frequenz zytokinproduzierender allergenspezifischer Zellen bestimmt. Dieses Verfahren wurde für 16 Bienengiftallergiker

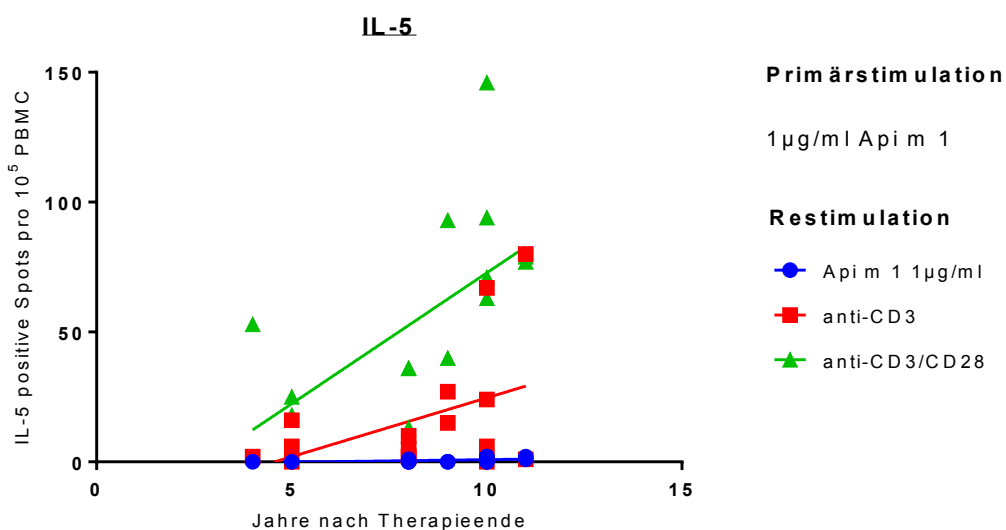
durchgeführt. Außerdem wurden sieben nicht-allergische Kontrollen mittels ELISPOT untersucht.

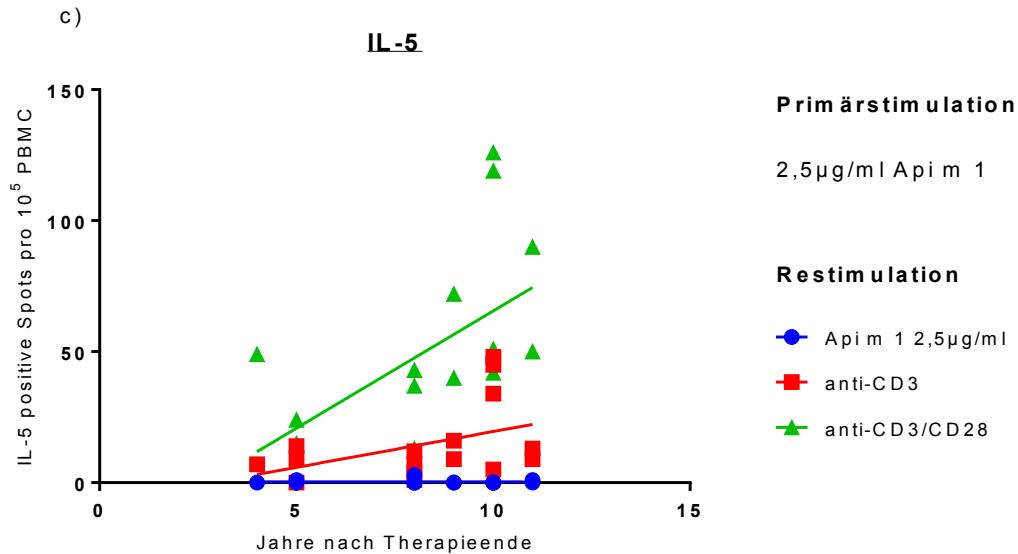
Wie bereits in 3.5.5 (Methoden) beschrieben, wurden unterschiedliche Konzentrationen des Bienengifts (0,1/1/2,5µg/ml) zur Prästimulation der PMBC verwendet. Bereits in vorherigen Arbeiten lieferte die Primärstimulation mit 0,1µg/ml Api m 1 die aussagekräftigsten Ergebnisse (Rudzio, 2015). Dies war auch in dieser Arbeit zu beobachten (Vergleiche Abb. 14). Aus diesem Grund werden im Folgenden die Ergebnisse nach Primärstimulation der Zellen mit 0,1µg/ml Api m 1 gezeigt.

a)



b)



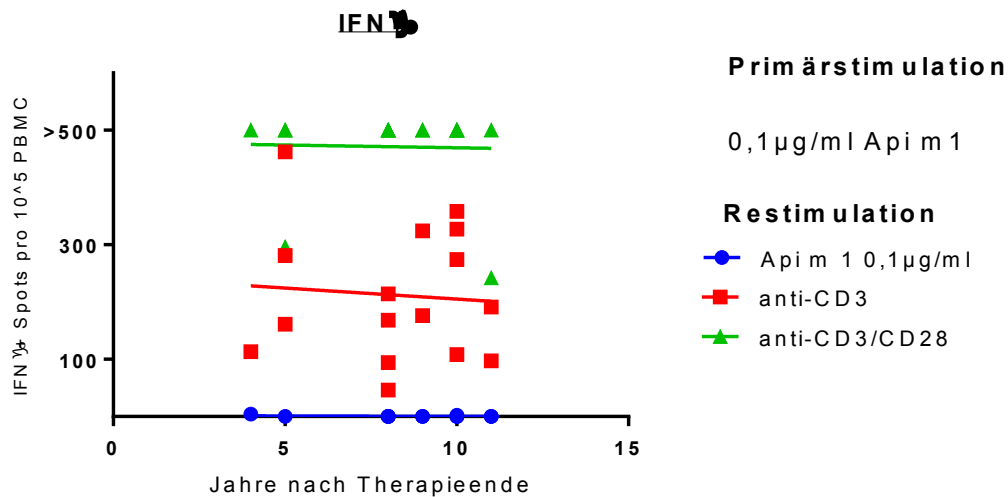


**Abbildung 14: Frequenzen Interleukin (IL)-5-positiver Spots nach Primärstimulation mit unterschiedlichen Api m 1 Konzentrationen**

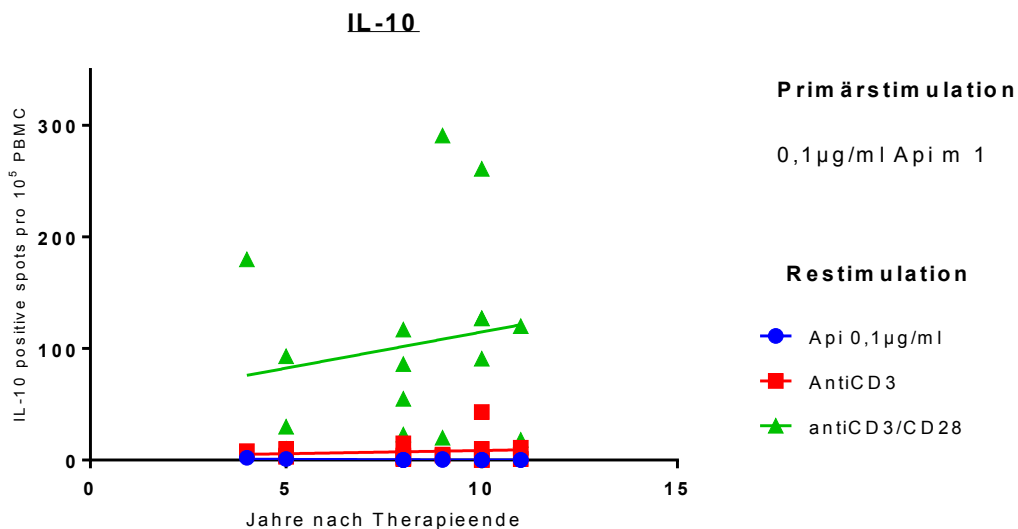
In den Abbildungen sind die Frequenzen IL-5-positiver Spots nach Primärstimulationen mit 0,1 (a), 1 (b) und 2,5 µg/ml (c) Api m 1 und den jeweiligen Restimulationen dargestellt. Deutlich wird, dass mit einer Primärstimulation von 0,1 µg/ml Api m 1 die Mehrzahl der Frequenzen IL-5-positiver Spots (nach anti-CD3/CD28 Restimulation) höher liegt als bei den Primärstimulationen mit 1 und 2,5 µg/ml. Des Weiteren zeigte sich eine Restimulation mit Api m 1 oder anti-CD3 weniger effektiv als mit anti-CD3/CD28.

Die Restimulation wurde (siehe 3.5.5) mit unterschiedlichen Stimuli durchgeführt: Api m 1 (in den o.g. Konzentrationen), anti-CD3 und anti-CD3/CD28. Es zeigte sich, dass es unter Restimulation mit anti-CD3/CD28 zu der stärksten Zytokinausschüttung kam und somit die meisten Spots detektiert werden konnten (Abb. 14). Lediglich Th1-Zellen ( $\text{IFN}\gamma^+$  Spots) zeigten unter diesem sehr starken T-Zell Stimulus eine so starke Proliferation, dass teilweise keine exakte Differenzierung der Spots mehr möglich war (Abb. 15). Die Th1-Zellen wurden daher für die Analyse mit dem etwas weniger stark aktivierenden anti-CD3 restimuliert.

Die Restimulation mit Api m 1 führte (in keiner der Konzentrationsstufen) zu einer über den Hintergrund hinausgehenden Zytokinsekretion und damit einer auswertbaren Spotanzahl.



**Abb. 15: Vergleich verschiedener Ansätze zur Restimulation im Rahmen der ELISPOT-Analyse.** Eine Restimulation der PBMC mit anti-CD3/CD28 (▲) führt zur überschießenden Proliferation der IFN $\gamma$ -sezernierenden T-Zellen (da diese Spots sowohl mittels ELISPOT Reader als auch manuell nicht mehr exakt zählbar waren, werden sie hier mit >500 spots angegeben). Die mit anti-CD3 restimulierten PBMC (■) sind dagegen sehr gut quantifizierbar. Die mit dem ELISPOT-Verfahren ermittelten Werte stellen die Anzahl IFN $\gamma$ -positiver Spots pro 10<sup>5</sup> PBMC dar.

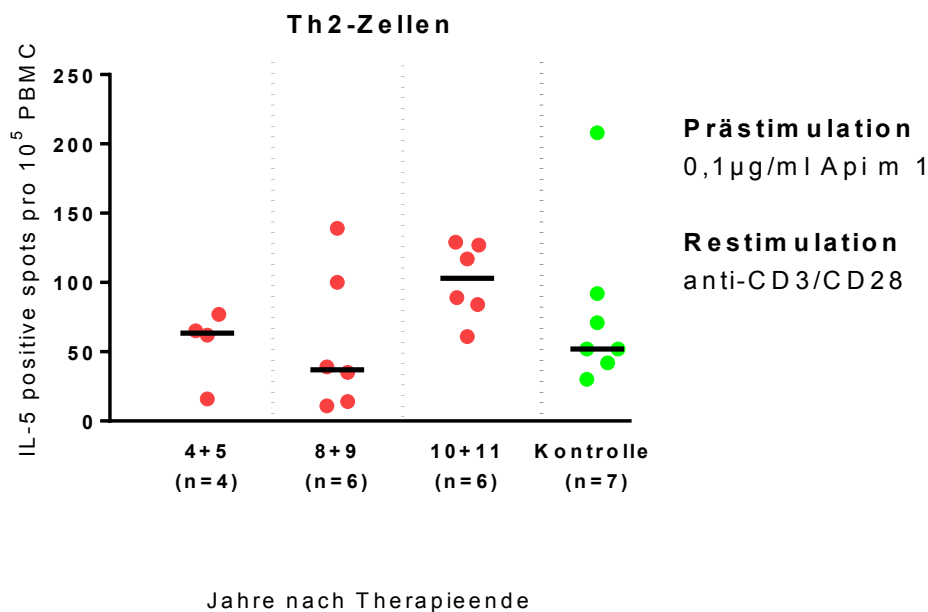


**Abb. 16: Vergleich verschiedener Ansätze zur Restimulation im Rahmen der ELISPOT-Analyse**

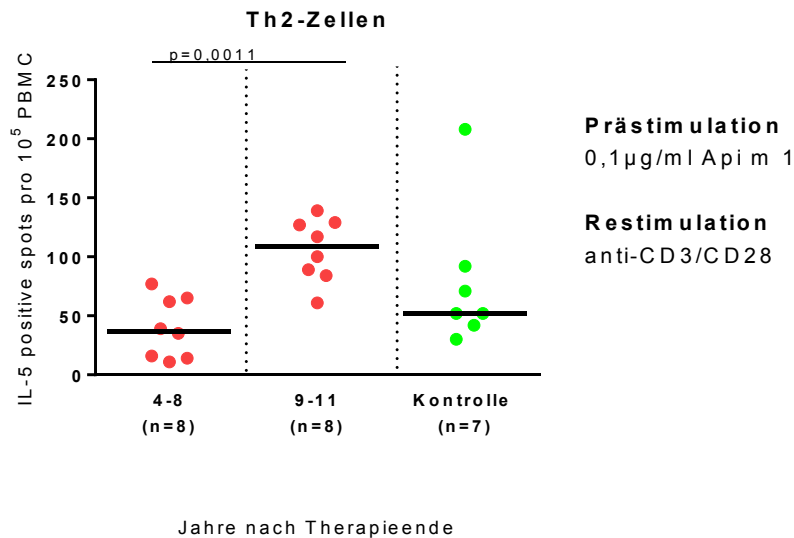
Diese Graphik zeigt IL-10-positive Spots nach Primärstimulation mit 0,1µg/ml Apm 1 und Restimulation mit Apm 1 (●), anti-CD3 (■) und anti-CD3/CD28 (▲). Die mit anti-CD3/CD28 restimulierten PBMC rufen eine wesentlich höhere IL-10-Produktion und infolge dessen mehr Spots hervor als die PBMC, die mit Apm 1 oder anti-CD3 restimuliert wurden.

Die Anzahl der IL-5-produzierenden Th2-Zellen befindet sich sowohl bei dem 4+5 Jahre, als auch 8+9 Jahre nach Abschluss der SIT untersuchten Patientenkollektiv auf einem ähnlichen Niveau wie das der Kontrollen (Abb.17a). Auffällig ist eine dagegen deutliche, wenn auch nicht signifikant höhere Frequenz Th2-Zellen bei dem 10+11 Jahre nach Abschluss der SIT analysierten Patientenkollektiv (insgesamt zeigen sich die Kollektive relativ heterogen). In einer Studie mit Milbenallergikern wurde gezeigt, dass Patienten im Durchschnitt 8 Jahre nach Abschluss der SIT wieder symptomatisch werden (Marogna et al., 2010). Aus diesem Grund wählten wir bezüglich der Th2-Zellen noch eine andere Gruppenzusammenstellung. (Abb. 17b) Hier wird der Unterschied der Api m 1-spezifischen IL-5-positiven Zellen zwischen den 4-8 Jahre und 9-11Jahre nach SIT untersuchten Patientengruppen signifikant. Somit besteht ein signifikanter Anstieg der Api m 1-spezifischen IL-5-positiven Zellen mit zunehmender Dauer nach Abschluss der SIT.

a)



b)

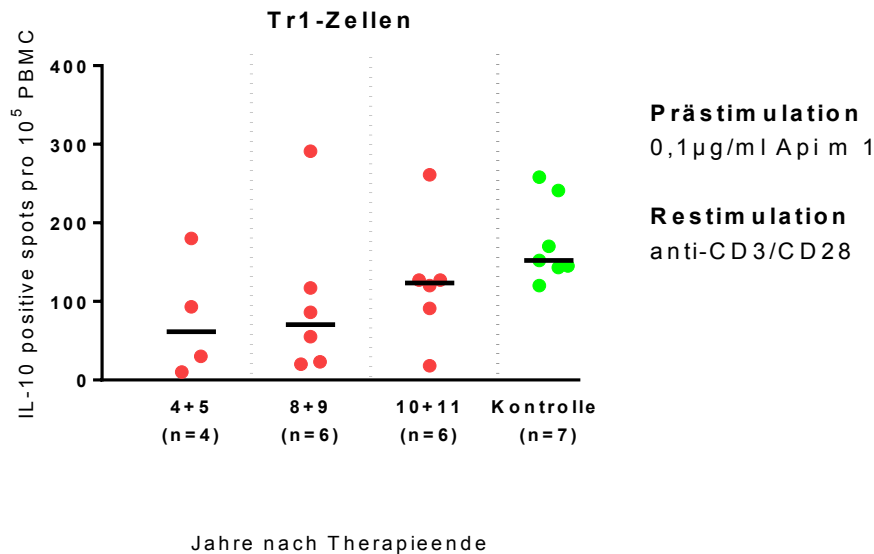


**Abb. 17a/b: Die Frequenz IL-5-produzierender Zellen nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT)**

a) die mit dem ELISPOT-Verfahren ermittelten Werte stellen die Anzahl IL-5-positiver Spots pro  $10^5$  PBMC dar. Während die 4+5 und 8+9 Jahre nach SIT untersuchten Patienten ähnliche Werte wie die nicht-allergischen Kontrollpersonen aufweisen, zeigen die später, nämlich 10+11 Jahre nach Therapieende analysierten Patienten eine demgegenüber deutlich erhöhte Anzahl an Api m 1-spezifischen Th2-Zellen.

b) das 9-11 Jahre nach Therapieende analysierte Patientenkollektiv zeigt eine signifikant erhöhte Anzahl an allergenspezifischen Th2-Zellen im Vergleich zur 4-8 Jahre nach SIT analysierten Patientengruppe. Statistisch signifikante Veränderungen ( $p < 0,05$ ) wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt.

Die Analyse der IL-10-produzierenden Zellen zeigte, dass die Zellzahlen (Mediane) insbesondere der 4+5 und 8+9 Jahre nach SIT untersuchten Kollektive nicht über, sondern tendenziell sogar unterhalb des Niveaus der Kontrollgruppe liegen.

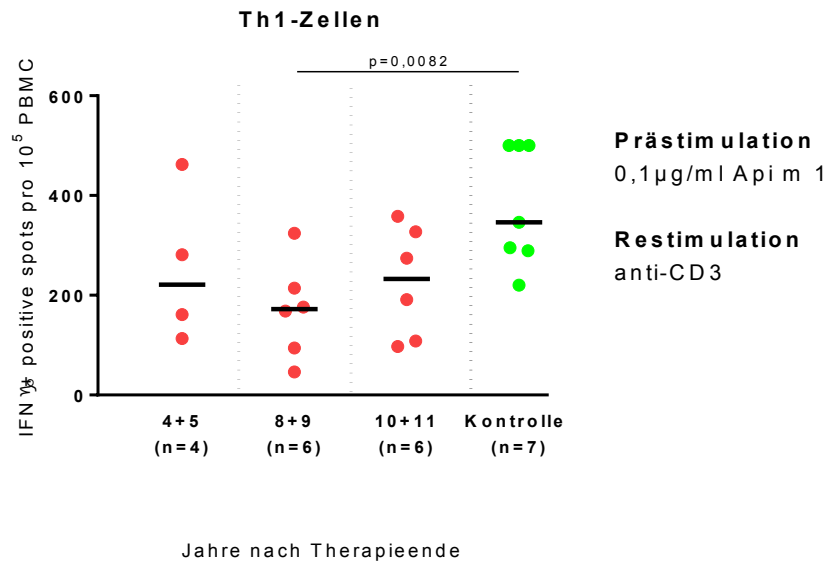


**Abb. 18: Die Frequenz IL-10-produzierender Zellen nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT)**

Die mit dem ELISPOT-Verfahren ermittelten Werte stellen die Anzahl IL-10-positiver Spots pro  $10^5$  PBMC dar. Die für das Patientenkollektiv ermittelten Werte liegen bei den drei Gruppen jeweils unterhalb der Werte der Kontrollgruppe.

Ähnlich der Resultate für allergenspezifische Tr1-Zellen gestalteten sich auch die Ergebnisse der Frequenzanalyse der Api m 1 spezifischen Th1-Zellen. Die 8+9 Jahre nach Abschluss der SIT untersuchte Patientengruppe besitzt eine signifikant niedrigere Anzahl an Th1-Zellen im Vergleich zum Kontrollkollektiv, während die 4+5 und 10+11 Jahre nach Therapieende analysierten Patientengruppen tendenziell geringere Frequenzen allergenspezifischer Th1-Zellen aufweisen (vgl. Abb.19).





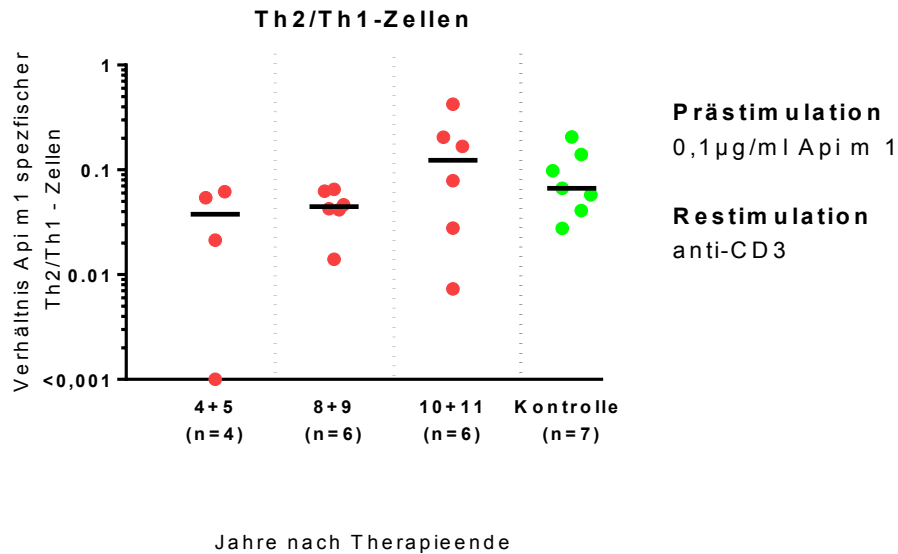
**Abb. 19: Die Frequenz IFN- $\gamma$ -produzierender Zellen nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT)**

Die mit dem ELISPOT-Verfahren ermittelten Werte stellen die Anzahl IFN- $\gamma$ -positiver Spots pro  $10^5$  PBMC dar. Die für das Patientenkollektiv ermittelten Werte liegen unterhalb der Werte der Kontrollgruppe. Statistisch signifikante Veränderungen ( $p < 0,05$ ) wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt.

### 4.3 Proportionale Veränderungen der einzelnen T-Zellsubpopulationen nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie

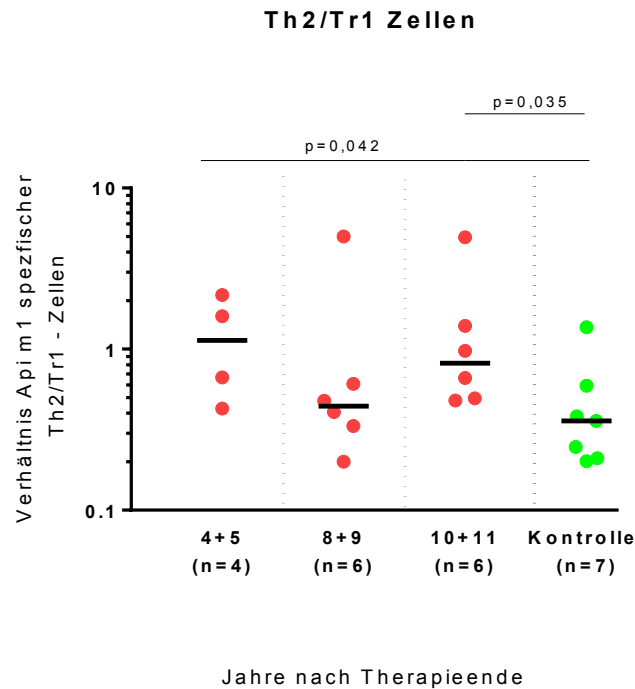
Da nicht nur die jeweilige Anzahl allergieassoziierten Zellen entscheidend für den Krankheitsverlauf sein kann, sondern auch die Relationen der allergieassoziierten Zellpopulationen zueinander, wurde das Verhältnis von potenziell protektiven Th1- bzw. Tr1-Zellen zu pathogenetisch relevanten allergenspezifischen Th2-Zellen bestimmt.

Der Quotient von allergenspezifischen Th2- zu Th1-Zellen liegt bei den 4+5 und 8+9 Jahre nach SIT untersuchten Patientengruppen auf ähnlichem Niveau wie bei der Kontrollgruppe, während der des 10+11 Jahre nach SIT untersuchten Kollektivs oberhalb des Niveaus der Kontrollgruppe liegt. Diese Werte zeigen jedoch nur Trends (Abb. 20).



**Abb. 20: Verhältnis Api m 1-spezifischer T-Helfer (Th) 2- zu Th1-Zellen nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT).** Dargestellt ist das Verhältnis allergenspezifischer IL-5-sezernierender Th2-Zellen zu IFN $\gamma$ -produzierenden Th1-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Abschluss der SIT.

Der Quotient Api m 1 spezifischer Th2- zu Th1-Zellen befindet sich bei der 4+5 und 10+11 Jahre nach Abschluss der SIT analysierten Patientenkohorte signifikant oberhalb der Kontrollgruppe (Abb. 21).



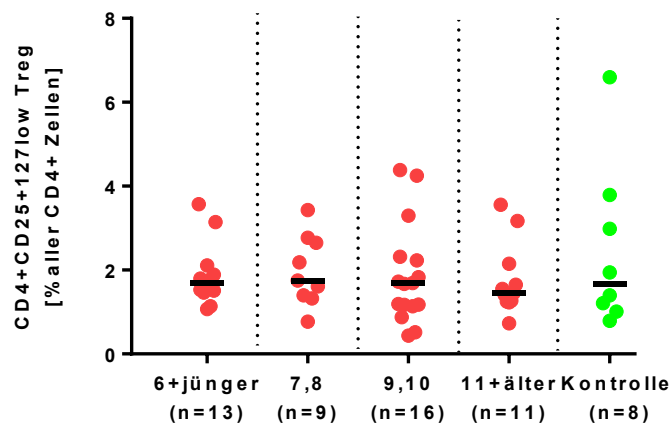
**Abb. 21: Verhältnis Api m 1-spezifischer T-Helfer (Th) 2- zu Typ-1-regulatorischen-T-Zellen nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT).** Dargestellt ist das Verhältnis allergenspezifischer IL-5-sezernierender Th2-Zellen zu IL-10-produzierenden Tr1-Zellen an verschiedenen Zeitpunkten nach Abschluss der SIT. Statistisch signifikante Veränderungen ( $p < 0,05$ ) wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt.

#### 4.4 Anzahl $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ regulatorischer T-Zellen nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie

Wie bereits in Kapitel 1.6.2 beschrieben, gibt es verschiedene Subgruppen an Treg-Zellen. Neben den mittels ELISPOT-Verfahren ermittelten IL-10-sezernierenden, induzierbaren regulatorischen Tr1-Zellen wurde mithilfe der Durchflusszytometrie auch der Anteil an  $Foxp3^+$  Treg-Zellen bestimmt.  $Foxp3^+$  Zellen stellen eine Population der Tregs dar, die nach Aktivierung in der Lage ist T-Effektorzellen zellkontaktvermittelt (und nicht zytokinabhängig) zu supprimieren (Stassen et al., 2004). Einige Studien haben herausgefunden, dass dieser Zelltyp durch die „Herunterregulation“ des Oberflächenmarkers CD127 gekennzeichnet ist. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in dieser Arbeit im FACS-Färbeprotokoll mit den Oberflächenantigenen CD4, CD25 und CD127

gearbeitet und in der Auswertung  $CD4^+CD25^+CD127^{low}$  als Markerprofil für die Darstellung von  $Foxp3^+$  Tregs gewählt (Liu et al., 2006; Seddiki et al., 2006). Hierfür war es wichtig, dass die Bestimmung der Zahl der  $CD4^+CD25^+CD127^{low}$  Tregs unmittelbar nach der Abnahme des peripheren Blut stattfand, da eine Kryokonservierung zum Verlust des Oberflächenmarkers CD25 dieser Zellpopulation führt (Elkord, 2009; Möbs et al., 2010).

In dem folgenden Graphen (Abb. 22) sind die Ergebnisse von 49 Insektengiftallergikern, denen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Abschluss der SIT Blut abgenommen wurde und 8 gesunden Kontrollen dargestellt.



**Abb. 22: Die Frequenz  $CD4^+CD25^+CD127^{low}$  regulatorischer Treg-Zellen nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT).** Die Anzahl an  $CD4^+CD25^+CD127^{low}$  Treg-Zellen ist an den unterschiedlichen Zeitpunkten nach Abschluss der SIT sehr konstant und unterscheidet sich nicht signifikant von der Kontrollpopulation. Die Treg-Zellen wurden hierbei mittels Durchflusszytometrie über die Oberflächenmarker  $CD4^+CD25^+CD127^{low}$  als eine Subpopulation aller  $CD4^+$  peripheren Blutlymphozyten bestimmt.

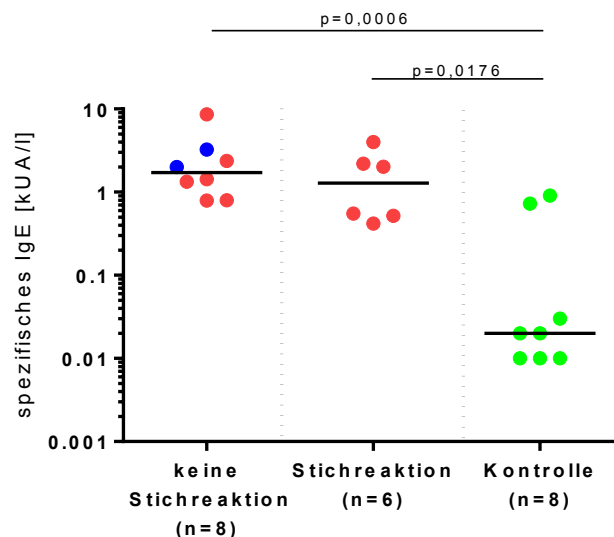
#### 4.5 Vergleich humoraler Marker mit klinischen Aspekten

Im Rahmen der klinischen Evaluation wurde von den Patienten ein Fragebogen bearbeitet (Dissertation Jan Adelmeyer, Universität Marburg). Hier wurde u.a.

nach erneuten Stichen bzw. der damit einhergehenden Stichreaktion bzw. den durchgeführten Maßnahmen gefragt. Aufgrund dieser klinischen Daten konnte eine Gruppe mit Feldstich nach Therapie ohne eine darauf folgende allergische Reaktion (n=8) und eine Gruppe mit Feldstich nach Therapie mit anschließender systemischer allergischer Stichreaktion (n=6) ermittelt werden. Die Patienten beider Gruppen gaben an, sich sicher zu sein, dass es sich bei dem Insekt um das ehemals allergieauslösende Insekt handelte.

Die Gruppen wurden in Bezug auf die bereits beschriebenen unterschiedlichen humoralen Marker miteinander verglichen. Außerdem dienten acht nicht-allergische Probanden als Kontrollgruppe.

Die Serumkonzentrationen der Bienen- und Wespengift-spezifischen IgE-Antikörper lagen bei beiden Patientengruppen signifikant oberhalb der Werte der Kontrollgruppe (Abb. 23). Allerdings gab es keine Unterschiede bzgl. der spezifischen IgE-Konzentrationen zwischen den Patienten, die allergisch auf einen weiteren Stich reagierten und den Patienten, bei denen eine allergische Reaktion infolge des Stiches ausblieb.

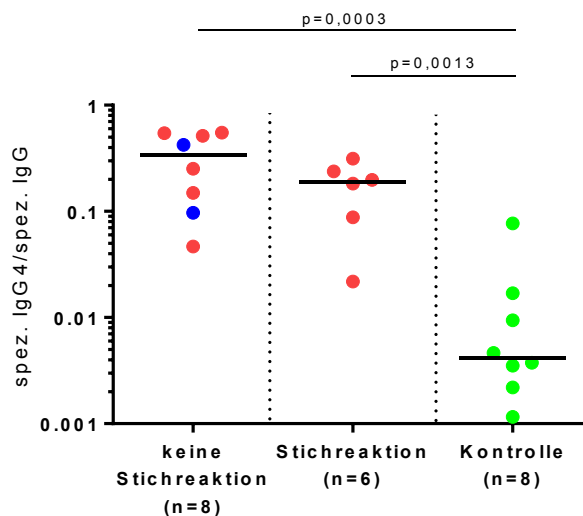


**Abb. 23: Allergenspezifische IgE-Antikörper bei Patienten ohne bzw. mit allergischer Reaktion infolge einer Stiche des ehemals allergieauslösenden Insekts nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie (SIT).** Die zwei Patientengruppen untereinander - Bienengiftallergiker (spezifisches IgE gegen Api m 1, ●) und Wespengiftallergiker (spezifisches IgE gegen Ves v 1 oder Ves v 5 – höherer Wert dargestellt, ●) - zeigen keine signifikanten Unterschiede. Die Konzentrationen des

spezifischen IgE sind bei den nicht-allergischen Kontrollen signifikant geringer als bei den Patienten. Statistisch signifikante Veränderungen ( $p < 0,05$ ) wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt.

Analog wurden die Patienten mit und ohne allergische Reaktion infolge eines Stiches des ehemals allergieauslösenden Insekts hinsichtlich der Serumkonzentrationen allergiespezifischen IgG und IgG4 verglichen. Auch bezüglich dieser Antikörperklassen konnten keinerlei Unterschiede zwischen den Gruppen gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Unterschiede zu den Kontrollen entsprechen den bereits in 4.1 gezeigten Daten.

Wie in 4.1 wurden auch die Verhältnisse von IgE zu IgG, IgE zu IgG4 und IgG4 zu IgG gebildet. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Daten nicht gezeigt). Lediglich das IgG4/IgG-Verhältnis ist tendenziell bei der Gruppe mit ausbleibender allergischer Stichreaktion etwas zugunsten des IgG4 verschoben.



**Abb. 24: Das Verhältnis Insektengift-spezifischer IgG4- zu IgG-Antikörper bei Patienten ohne und mit allergischer Reaktion infolge einer Stiche des ehemals allergieauslösenden Insekts nach Abschluss der spezifischen Immuntherapie..**

Bei den Patienten (Bienengiftallergiker ●, Wespengiftallergiker ●) ohne allergische Stichreaktion ist das Verhältnis allergenspezifischer IgG4/IgG etwas mehr zugunsten des IgG4 verschoben als bei Patienten mit allergischer Stichreaktion. Nicht-allergische Kontrollen besitzen einen signifikant geringeren IgG4-Anteil als das Patientenkollektiv. Statistisch signifikante Veränderungen ( $p < 0,05$ ) wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt.

Ein ELISPOT-Vergleich war an dieser Stelle nicht möglich, da die betreffenden Kollektive nur 2 Bienengiftallergiker beinhalteten. Zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente war die ELISPOT-Analyse lediglich für diese Patienten durchführbar, da nur Api m 1 (nicht aber Ves v 1 bzw. Ves v 5) kommerziell verfügbar war.

## **5 Diskussion**

Die vorliegende Studie stellt eine Querschnittsuntersuchung der nach Abschluss der SIT bestehenden immunologischen Veränderungen auf zellulärer und humoraler Ebene bei Patienten mit Insektengiftallergie dar. Um eine mögliche Dynamik im zeitlichen Verlauf detektieren zu können, wurden Patienten untersucht, die sich an unterschiedlichen Zeitpunkten nach Abschluss der SIT befanden. Es erfolgte die Bestimmung der Serumkonzentrationen allergenspezifischer Antikörper sowie der Frequenzen allergenspezifischer Th- und Treg-Zellpopulationen. Zudem erfolgte ein Vergleich klinischer und immunologischer Parameter.

### **5.1 Immunologische Mechanismen nach Abschluss der SIT**

#### **5.1.1 Marker der humoralen Immunantwort nach Abschluss der SIT**

##### **5.1.1.1 Gesamt-IgE**

Bei vielen allergischen Erkrankungen findet sich ein erhöhtes Gesamt-IgE. In der Literatur ist beschrieben, dass bei Insektengiftallergikern im Gegensatz zu anderen Typ-1-Allergikern jedoch kein erhöhtes Gesamt-IgE vorliegt (Haye & Dosen, 2005). Konkordant mit der Literatur sind die Ergebnisse dieser Studie einzustufen. Die Patienten wiesen zu allen Zeitpunkten nach Abschluss der SIT ähnliche Gesamt-IgE-Level wie die nicht-allergischen Kontrollen auf. Lediglich eine Patientengruppe ( $\leq 6$  Jahre nach SIT) zeigte eine Abweichung vom Restkollektiv. Diese Abweichung könnte sich dadurch erklären, dass die Auswahlkriterien für die nicht-allergischen Kontrollen eine unauffällige Allergieanamnese beinhaltete, während bei dem Patientenkollektiv teilweise auch andere Typ-I-Allergien (z.B. gegen Aeroallergene wie Gräser oder Birke) vorlagen, bei denen ein erhöhtes Gesamt-IgE beschrieben ist. Insbesondere bei den Patienten in der o.g. Gruppe ( $\leq 6$  Jahre nach SIT) bestanden andere IgE-vermittelte Allergien.



Bei der Insektengiftallergie nehmen die allergenspezifischen Antikörper wie das spezifische IgE oder IgG4 während der SIT eine weitaus bedeutendere Rolle ein und zeigten teilweise auch nach Therapieende charakteristische Verläufe.

### **5.1.1.2 Allergenspezifisches IgE**

Im Rahmen dieser Studie wurden als Marker der humoralen Immunantwort die insektengiftspezifischen IgE- und IgG-Antikörper untersucht. In der Vergangenheit wurde intensiv an der Aufdeckung der Immunmechanismen, die zur Toleranzentwicklung während der SIT führen, geforscht. Die Forschungsergebnisse bezüglich der Entwicklung spezifischer IgE-Level im zeitlichen Verlauf der SIT sind bislang nicht einheitlich.

Es wurde u.a. beobachtet, dass es zu Beginn der SIT zu einem Anstieg des spezifischen IgE kam, welchem ein Abfall auf Werte deutlich unterhalb der Ausgangswerte folgte (Bousquet et al., 1986; Carballada et al., 2010; Ferrante et al., 1986; Gleich et al., 1982; Van Ree et al., 1997). Andere Forschungsgruppen berichteten über einen kontinuierlichen Anstieg (Antunez et al., 2008) oder gleichbleibende spezifische IgE-Level (Gehlhar et al., 1999).

Über den Verlauf der spezifischen IgE-Antikörper nach Abschluss der SIT gibt es wesentlich weniger Erkenntnisse. Einige Studien besagen, dass auch nach erfolgreich abgeschlossener SIT bei den meisten Patienten noch detektierbare IgE-Level vorliegen (Erzen et al., 2012; Golden, 2010). Eine spanische Studie dagegegen zeigte einen progredienten Abfall des spezifischen IgE auch nach Abschluss der SIT (Carballada et al., 2010). Ebenfalls konnte eine weitere Studie mit Kindern einen Abfall der spezifischen IgE Werte während SIT zeigen, der auch noch zwei Jahre nach Beendigung der SIT fortschreitend war (Varga et al., 2009). Die Werte zwei Jahre nach Ende der SIT lagen nur minimal über denen der nicht-allergischen Kontrollen. Über die Relevanz der teilweise divergierenden Studienergebnisse bzgl. der spezifischen IgE-Werte sowohl während als auch nach SIT lässt sich nur spekulieren. Unterschiedliche Messverfahren und Abnahmezeitpunkte könnten eine mögliche Ursache darstellen. Auch könnten unterschiedliche Darreichungsformen der Hyposensibilisierung (subcutan vs. sublingual) oder das ursächliche Allergen den IgE-Verlauf während bzw. nach SIT beeinflussen.

Bei den in Kapitel 4.1.2 beschriebenen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass fast alle Patienten (Wespengiftallergiker: 100%, Bienengiftallergiker 81,25%) nach Abschluss der SIT noch detektierbare insektengiftspezifische IgE-Antikörper aufweisen. Die Werte lagen signifikant höher als bei den nicht-allergischen Kontrollen und es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Patientengruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Abschluss der SIT festgestellt werden.

In der Arbeitsgruppe Klinisch-Experimentelle Allergologie der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Philipps-Universität Marburg wurden auch Insektengiftallergiker vor und während einer SIT untersucht. Ein Vergleich mit den dabei ermittelten humoralen Immunparameter zeigt, dass die spezifischen IgE-Werte 5-12 Jahre nach Abschluss der SIT (Median = 0,66kUA/l) signifikant unterhalb der Werte vor (Median = 2,02kUA/l) und während (8-24 Monate; Median = 2,04kUA/l) SIT lagen (Möbs et al., 2015). Während sich also die spezifischen IgE-Werte während SIT kaum verändern, liegen dagegen mehrere Jahre nach Beendigung der SIT deutlich niedrigere Werte vor. Dennoch zeigt sich nach wie vor eine Sekretion allergenspezifischer Antikörper.

Ein möglicher Erklärungsansatz für das Fortbestehen der Antikörperproduktion auch viele Jahre nach Abschluss der SIT ist die Persistenz langlebiger Plasmazellen. Es wird angenommen, dass langlebige und kurzlebige Plasmazellen zwei unterschiedlichen Populationen darstellen und ein Teil der Plasmablasten in der Lage ist, in langlebige Plasmazellen auszureifen (Ho et al., 1986). Die Lebensspanne von langlebigen Plasmazellen in bestimmten „Überlebensnischen“ (z.B. Knochenmark) kann Monate bis Jahrzehnte betragen. Sie zeichnen sich durch die anhaltende Produktion von hochaffinen antigenspezifischen Antikörpern aus (Hiepe & Dorner, 2005; Radbruch et al., 2006).

Die Tatsache, dass es dennoch zu einem kontinuierlichen Absinken der spezifischen IgE-Produktion kam, könnte dafür sprechen, dass ein Teil der allergenspezifischen langlebigen Plasmazellen im Laufe der Jahre aus diesen Überlebensnischen verdrängt wurde und somit eine kontinuierlich hohe Antikörperproduktion nicht mehr aufrecht erhalten werden konnte. Eine weitere Ursache für die signifikant erniedrigten IgE-Level viele Jahre nach Beendigung

der SIT könnte auch der Mangel an Allergenexposition und die daraus resultierende fehlende „Boosterung“ darstellen. Anders als bei Aeroallergenen besteht bei Hymenoptereingiftallergikern kein regelmäßiger natürlicher Allergenkontakt. Dies verhindert z.B. die Ausdifferenzierung von neuen langlebigen Plasmazellen und die weitere kontinuierliche Antikörperproduktion.

### **5.1.1.3 Allergenspezifisches IgG4**

Verschiedene Arbeiten haben sich mit dem Verlauf des spezifischen IgG, insbesondere der Subgruppe IgG4, während der SIT beschäftigt. Es konnte gezeigt werden, dass es zu einem signifikanten Anstieg des spezifischen IgG4 während der SIT kommt (Antunez et al., 2008; Erzen et al., 2012).

An eine beendete SIT angeschlossene Untersuchungen bei Insektengiftallergikern, die den Zeitraum bis zu zwei Jahre nach Abschluss der SIT umfassten, zeigten bereits, dass der Anstieg des IgG4 jedoch nicht nach Abschluss der SIT aufrecht erhalten wird, sondern wieder auf Konzentrationen nahe der Ausgangswerte vor SIT abfällt. Es konnte zwar ein kurzfristiger Anstieg nach Provokation festgestellt werden. Hier handelt es sich allerdings am ehesten um ein durch bereits existente Gedächtnis-B-Zellen vermittelten Effekt, der einmalig nach Allergenexposition auftritt, da die Antikörperproduktion durch kurzlebige Plasmazellen vermittelt wird und nicht von Dauer (Erzen et al., 2012; Varga et al., 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit zeigten sich allerdings auch nach Abschluss der SIT im Vergleich zu nicht-allergischen Kontrollen signifikant erhöhte IgG4-Werte. Dabei gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Abschluss der SIT untersuchten Kollektiven. Analog zu den spezifischen IgE-Werten wurden auch diese mit außerhalb dieser Studie erhobenen spezifischen IgG-Konzentrationen von Insektengiftallergikern vor bzw. während SIT verglichen.

Das IgG4 zeigte sich bei Patienten 5-12 Jahre nach Abschluss der SIT (Median = 0,62mgA/l) signifikant erniedrigt im Vergleich zu IgG4-Werten, die 8-24 Monate nach Beginn aber noch unter SIT erhoben wurden (Median = 4,12mgA/l), lag jedoch noch geringfügig höher als bei Patienten vor Beginn der

SIT (Median = 0,15mgA/l (Möbs et al., 2015). Dies stimmt mit Ergebnissen verschiedener Studien zur SIT mit Aeroallergenen überein (Möbs et al., 2012).

In neueren Arbeiten konnte bisweilen zudem gezeigt werden, dass nicht nur die quantitative Höhe der Serumkonzentration des IgG4 von Bedeutung ist, sondern auch die funktionellen Eigenschaften im Sinne der Blockierung einer Allergenbindung an IgE-Antikörper möglicherweise einen wichtigeren Stellenwert einnehmen. So wird vermutet, dass Allergentoleranz unter anderem durch die Komplexbildung der IgG-Antikörper (insbesondere der IgG4-Subgruppe) mit dem spezifischen Allergen vermittelt wird, das dann nicht mehr von membrangebundenen IgE-Antikörpern fixiert werden kann (siehe 5.2; Möbs et al., 2012; Shamji et al., 2012).

### **5.1.1.4 IgE/IgG4-Verhältnis**

Wird das Verhältnis von allergenspezifischem IgE zu IgG4 betrachtet, so zeigte sich bei den Patienten nach SIT ein deutlich zugunsten des IgE verschobenes Verhältnis im Vergleich zu dem nicht-allergischen Kontrollkollektiv. Wird das IgE/IgG4-Verhältnis allerdings mit Patienten vor und während SIT verglichen, so zeigt sich, dass es auch Jahre nach Abschluss der SIT noch zugunsten des IgG4 im Vergleich zum Zeitpunkt vor Therapiebeginn verschoben ist und nur geringfügig von Werten während SIT abweicht (Möbs et al., 2015).

Trotz stark abfallender IgG4-Werte auf ein ähnliches Level wie zu Beginn der SIT bleibt also ein recht „günstiges“, d.h. in Richtung IgG4 verschobenes, IgE/IgG4-Verhältnis erhalten. Die Bestimmung dieses Quotienten ermöglicht eine quantitative Aussage über das Verhalten der beiden Parameter zueinander. Das „günstige“ Verhältnis ist über die auch nach Ende der SIT weiterhin abfallenden spezifischen IgE-Antikörper zu erklären. Dies wiederum könnte allerdings auf eine mangelnde Boosterung durch fehlende Allergenexposition zurückzuführen sein und muss nicht zwangsläufig für eine weiterhin bestehende Toleranz sprechen. Ebenfalls gegen eine Korrelation zwischen dem Verhältnis von spezifischem IgE/IgG4 und einer (noch) bestehenden Toleranz spricht die mangelnde Korrelation des IgE/IgG4-Verhältnisses zu der Blockierungskapazität des Serums. In diesem

Zusammenhang scheint das IgG4 eine entscheidendere Rolle zu spielen (Möbs et al., 2015). Hierauf wird genauer in 5.2 eingegangen.

### **5.1.2 Marker der zellulären Immunantwort nach Abschluss der SIT**

#### **5.1.2.1 Frequenzen einzelner T-Zellpopulationen**

T-Zellen und deren jeweilige Subpopulationen stellen einen wichtigen Aspekt bei der Erforschung der Immunmechanismen allergischer Erkrankungen dar. Insbesondere dem Ungleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Zellen wurde schon in den letzten Jahrzehnten ein bedeutender Teil bei der Entstehung von Allergien zugesprochen (Lagier et al., 1995; Romagnani, 2004). Es gibt zahlreiche Arbeitsgruppen, die sich mit der Induktion oder Suppression verschiedener T-Zellsubpopulationen während SIT beschäftigen. Während es auf T-Zellebene bei Aeroallergien viele Daten gibt, ist die Datenlage bei der Hymenopterenallergie noch recht überschaubar.

In diesem Zusammenhang wurden in dieser Arbeit Blut von Bienengiftallergikern 4-11 Jahre nach Abschluss der SIT untersucht, um verschiedene T-Zellpopulationen zu identifizieren und quantifizieren.

#### **5.1.2.2 T-Helfer-Zellen nach Abschluss der SIT**

Unterschiedliche T-Zell-vermittelte Immunreaktionen wurden über Jahre als Basis der immunologischen Toleranz angesehen. Da angenommen wird, dass bei der Soforttypallergie wie der Insektengiftallergie eine Dominanz von Th2-Zellen vorliegt, wurde gefolgert, dass die SIT zu einer Verlagerung von Th2- zu Th1-dominierenden Immunantworten führt (Benjaponpitak et al., 1999; Durham et al., 1991; Ebner et al., 1997).

Dass sich das Verhältnis von Th2- zu Th1-Zellen zugunsten der Th1-Zellen während SIT verschiebt, ist mittlerweile durch viele Daten belegt. Gründe können ein Th2-Zellabfall bei gleichbleibenden Th1-Zell-Frequenzen (Möbs et al., 2012; Wambre et al., 2014) oder aber ein gleichzeitiger Th1-Zellanstieg (Schulten et al., 2014) sein.

In dieser Arbeit befanden sich die allergenspezifischen Th1-Zellen bei allen Patienten auf einem tendenziell niedrigeren Level als bei dem nicht-allergischen

Kontrollkollektiv. Bei den Th2-Zellen zeigte sich ein deutlicher Anstieg in der Patientengruppe, bei der die Therapie am längsten zurücklag (10+11 Jahre nach SIT) im Vergleich zu den Patienten, die ihre SIT erst vor kürzerer Zeit abgeschlossen hatten. Signifikant war dieser Anstieg beim Vergleich der 4-8 Jahre nach SIT und 9-11 Jahre nach SIT analysierten Kollektive. Im Vergleich mit Patientendaten vor und während Therapie zeigten sich sowohl Th1- als auch Th2-Zellen nach Therapieende zunächst erniedrigt, stiegen aber zum Zeitpunkt 10+11 Jahre nach Therapieende wieder an, insbesondere die Th2-Zell-Frequenzen (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe klinisch-experimentelle Allergologie Marburg, vorgestellt beim Collegium Internationale Allergologicum 2014, Bonn). Hier kann diskutiert werden, dass dieser Anstieg der Th2-Zellen bereits den ersten Schritt eines Toleranzverlustes darstellen könnte. Werden die Pathomechanismen der Allergieentstehung betrachtet (siehe 1.3), so wird deutlich, dass die zelluläre Reaktion (durch Th2-Zellen ausgeschüttetes IL-4, IL-5 und IL-13) der humoralen Reaktion (Antikörperklassenwechsel zu IgE) vorausgeht. Erst vor kurzem wurde berichtet, dass die Anzahl der Th2-Zellen mit den klinischen Symptomen bei Gräserallergie korreliert und die Th2-Zytokinproduktion als Marker zum Therapiemonitoring vorgeschlagen (Schulten et al., 2014).

Um dieser Hypothese nachzugehen, wären weitere Nachuntersuchungen in den folgenden Jahren oder mit einer Patientengruppe, bei der die SIT vor noch länger als elf Jahren beendet worden ist, anzustreben.

### **5.1.2.3 Regulatorische T-Zellen nach Abschluss der SIT**

Es gilt mittlerweile als akzeptiert, dass Treg-Zellen sowohl in der gesunden Immunantwort als auch in der Toleranzinduktion während der SIT einen essentiellen Stellenwert einnehmen (Bellinghausen et al., 2006). In diesem Zusammenhang wurden in dieser Arbeit folgende zwei Subpopulationen an Treg-Zellen untersucht.

### **5.1.2.4 Typ1-regulatorische T-Zellen**

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass allergenspezifische IL-10-produzierende Tr1-Zellen während der SIT induziert werden (Bohle et al., 2007; Jutel et al., 2003; Möbs et al., 2010; Yamanaka et al., 2009). Diese Induktion

scheint bereits zu einem frühen Zeitpunkt (7 Tage nach Einleitung) während der SIT einzutreten (Akdis et al., 1998). Über das Verhalten dieser Subpopulation nach Therapieende ist allerdings sehr wenig bekannt. Diese während SIT zu beobachtende Induktion der Tr1-Zellen wurde allerdings auch in einer der Langzeitstudien mit Birkenpollenallergikern als lediglich transient beschrieben und konnte zu späteren Zeitpunkten der SIT sowie nach Abschluss der Therapie nicht mehr nachgewiesen werden (Moöbs et al., 2012).

In dieser Arbeit wurde entsprechend gezeigt, dass bei den untersuchten Bienengiftallergikergruppen nach Abschluss der SIT im Vergleich zum nicht-allergischen Kontrollkollektiv insgesamt eher erniedrigte Tr1-Zell-Level vorlagen. Zudem lag der Quotient Api m 1-spezifischer Th2- zu Tr1-Zellen bei allen Patientengruppen oberhalb des Medians der Kontrollgruppe.

Da es also im Verlauf der SIT zu einem Anstieg der Tr1-Zellen kommt (s.o.), dieser allerdings nur als transient beschrieben wurde und auch in dieser Arbeit keine dauerhaft erhöhten Tr1-Zell-Level nach Abschluss der Therapie gezeigt wurden, lässt sich schlussfolgern, dass die Tr1-Zellen zwar eine Schlüsselrolle in der Toleranzinduktion einnehmen, allerdings in der Aufrechterhaltung der Toleranz eine eher untergeordnete Rolle spielen.

In diesem Zusammenhang konnten andere Studien mit Aero- oder Erdnussallergikern zeigen, dass eine klinische Persistenz der Toleranz trotz abfallender IL-10-Expression (nach transientem Anstieg) im Verlauf der SIT zu beobachten war, was diese Hypothese ebenfalls untermauern würde (Bohle et al., 2007; Jones et al., 2009; Nieminen et al., 2009). Für die fortbestehende Toleranz müssten daher andere Parameter wie der Verlust allergenspezifischer Th2-Zellen (s.o.) oder humorale Mechanismen (s.o.) verantwortlich sein.

#### **5.1.2.5 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> regulatorische T-Zellen**

Möglich wäre auch eine wichtige Rolle anderer Treg-Populationen. Im Gegensatz zu den Tr1-Zellen scheinen die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> Treg-Zellen nicht zytokinabhängig zu agieren. Die Mechanismen ihrer regulatorischen Funktion sind bis heute nicht abschließend geklärt, allerdings wird u.a. eine zellkontaktabhängige Wirkungsweise angenommen (Asano et al., 1996; Jonuleit et al., 2001; Levings et al., 2001). Da in der Vergangenheit gezeigt

werden konnte, dass der intrazelluläre Marker Foxp3 mit dem Oberflächenmolekül CD127 invers korreliert (Liu et al., 2006), erfolgte die Frequenzanalyse der natürlichen Foxp3<sup>+</sup> Treg-Zellen in dieser Arbeit durchflusszytometrisch anhand der Expression des Markerprofils CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>.

Bisherige Studienergebnisse bezüglich des Verlaufs der Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen während der SIT divergieren. Bei Insektengiftallergikern konnte einerseits eine quantitative Zunahme nach einigen Monaten der SIT gezeigt werden, die auch mit einem Shift im IgE/IgG4-Verhältnis korrelierte (Pereira-Santos et al., 2008). Andere Arbeitsgruppen wiederum konnten dies nicht bestätigen. Bei sonstigen Allergien wie beispielsweise gegen Aeroallergene oder Nahrungsmittel ist die Datenlage ebenfalls nicht eindeutig. Es konnten sowohl quantitative Unterschiede im Verlauf der SIT gezeigt (Radulovic et al., 2008; Shreffler et al., 2009) als auch negiert werden (Ajduk et al., 2008; Grindebacke et al., 2009).

Die FACS-Analyse der Treg-Zellen in dieser Studie ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen und zum Kontrollkollektiv. Auch konnte in der Arbeitsgruppe der Klinisch-Experimentellen Allergologie der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Philipps-Universität Marburg gezeigt werden, dass vor und während der SIT sehr stabile Frequenzen dieser regulatorischen T-Zellpopulation bei allen Patientengruppen vorliegen (Möbs C., 2014). Übereinstimmend mit der Literatur (Bellinghausen et al., 2003; Yamanaka et al., 2009) fand sich zudem, dass es keinen quantitativen Unterschied in der Frequenz der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> Treg-Zellen zwischen den Allergikern und dem nicht-allergischen Kontrollkollektiv gibt.

Diese fehlenden Änderungen während und nach SIT sprechen somit dafür, dass die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> Treg-Zellen keine essentielle Rolle in der Toleranzinduktion oder -aufrechterhaltung während bzw. nach Abschluss der SIT spielen, wiewohl mögliche funktionelle Einflüsse unabhängig von der Zahl nicht auszuschließen sind.



## **5.2 Eignung der immunologischen Parameter zur Aussage über den bestehenden Schutz gegenüber erneuten Stichen**

Bei der Insektengiftallergie handelt es sich um ein potentiell lebensbedrohliches Krankheitsbild. Zwar existiert mit der SIT ein effektiver, ursächlich wirksamer Therapieansatz (Boyle et al., 2012; Hunt et al., 1978; Muller et al., 1979), trotzdem gibt es immer wieder Patienten, die nach Abschluss der SIT erneut allergisch auf einen Feldstich reagieren. Die Prozentzahl dieser „Therapieversager“ divergiert je nach Studie, Allergen (Bienen- oder Wespengift) und Zeitpunkt der Untersuchung (Haugaard et al., 1991; Muller et al., 1991; Urbanek et al., 1985). Eine allergenspezifische Toleranz unter SIT wird laut aktueller Datenlage bei ca. 90 % (Golden, 2010) der Patienten erreicht. Einige Arbeiten weisen darauf hin, dass die Erfolgsraten bei der Wespengiftallergie etwas höher liegen als bei der Bienengiftallergie (Lang & Hawranek, 2006; Lerch & Muller, 1998; Muller et al., 1992).

Die Literatur besagt allerdings auch, dass die hohen Erfolgsquoten nach Abschluss der SIT nicht anhalten. Golden et al. beschrieb systemische allergische Reaktionen (SAR) bei 14,3% der Patienten sieben Jahre und bei 16,7% zehn Jahre nach SIT (Golden, 2010). Haye et. al beobachteten SARs bei bis zu 22% der Wespengiftallergiker fünf oder mehr Jahre nach Abschluss der SIT (Haye & Dosen, 2005). Andere Langzeitbeobachtungen beschrieben dagegen etwas niedrigere Raten an SARs (Lerch & Muller, 1998; Reisman, 1993). Da viele Patienten nach der Therapie nicht mehr gestochen werden und sich einige o.g. Daten auf Feldstiche stützen, liegt es nahe, dass die Raten des Toleranzverlusts sogar noch höher liegen. Gezeigt werden konnte allerdings auch, dass sich die Rezidive zumeist weniger ausgeprägt als vor Beginn der SIT gestalten. Allerdings ist auch bekannt, dass schwere SARs insbesondere nach vorausgegangenen tolerierten Stichen nach Abschluss der SIT auftraten (Lang & Hawranek, 2006). Die tolerierten Stichereignisse könnten also eine Resensibilisierung und einen Schritt zum Toleranzverlust darstellen.

Stichprovokationen stellen die einzige Möglichkeit zur Kontrolle des Therapieerfolges dar (Dubois, 2003; Franken et al., 1994). Diese sind allerdings nur während der laufenden SIT indiziert. Nach Abschluss der SIT sollten nach aktueller Leitlinie keine Stichprovokationen durchgeführt werden, da diese (wie

oben beschrieben) die Gefahr einer erneuten Sensibilisierung mit sich bringen (Przybilla et al., 2011). Dem entgegen stehen jedoch Daten, die keine Erhöhung des Risikos für eine anaphylaktischen Stichreaktion durch sequentielle Stiche nach Abschluss der beobachteten (Golden et al., 1996).

Im Rahmen zahlreicher, teils prospektiver Studien konnten einige klinische Risikofaktoren identifiziert werden, die eine Assoziation mit erneuten und/oder fortbestehenden allergischen Reaktionen zeigen. Dazu zählen schwere allergische Reaktionen vor Beginn der SIT (Keating et al., 1991; Reisman, 1993), das Vorliegen einer Bienengiftallergie (Muller et al., 1992), aufgetretene systemische Reaktionen (nach Feldstich oder SIT Injektion) unter laufender SIT (Golden et al., 1989b; Muller et al., 1991), ein frühzeitiger Abbruch der Therapie bzw. zu geringe Therapiedauer (Golden, 2010; Keating et al., 1991) sowie eine hohe Stichfrequenz nach Abschluss der SIT (Golden et al., 2000; Lerch & Muller, 1998).

In der Vergangenheit wurden bereits erhöhte Serumtryptase-Werte, eine bestehende Mastozytose und eine erhöhte Basophilen-Sensitivität als laborchemische Risikofaktoren für eine schwere anaphylaktische Reaktion sowie das Auftreten erneuter anaphylaktischer Reaktionen nach Beendigung (mittlerweile wird bei erhöhten Tryptasewerten bzw. Mastozytose eine lebenslange SIT empfohlen) der SIT vorgeschlagen (Bonadonna et al., 2009; Erzen et al., 2012; Haeberli et al., 2003; Kosnik et al., 2005; Niedoszytko et al., 2009; Ruëff et al., 2009). Diese werden aktuell aufgrund neuerer und größer angelegter Studien teilweise auch kontrovers diskutiert (Ruëff et al., 2013).

In der Literatur findet man immer wieder Angaben, dass ein alternatives Kriterium für eine Beendigung der SIT eine negative Hauttestung sei. Gleichzeitig wird jedoch betont, dass dies nicht sicher für den Verlust der allergischen Reaktionsbereitschaft spreche (Przybilla et al., 2011). Auch unsere Arbeitsgruppe verglich die Hautreaktivität (Prick- und Intrakutantest) vor, während (3-4 Jahre unter SIT) und nach (5-12 Jahre nach Abschluss) SIT. Es zeigte sich eine signifikant geringere Hauttestreaktivität bis hin zur negativen Prick/Intrakutantestung unter SIT im Vergleich zum Kollektiv vor SIT. Bei dem Patientenkollektiv 5-12 Jahre nach Abschluss der Therapie fand sich jedoch wiederum ein positives kutanvaskuläres Testergebnis bei allen Patienten. Diese

berichteten jedoch zum Teil auch über tolerierte Feldstiche mit dem ehemals allergieauslösenden Insekt, so dass eine Korrelation zwischen Hauttestreaktivität und fortbestehender Toleranz bzw. Schutz vor erneuten allergischen Stichreaktionen nicht angenommen werden kann (unveröffentlichte Daten der Forschungsgruppe klinisch-experimentelle Allergologie der Universität Marburg).

Nun stellt sich somit die Frage, ob es weitere immunologische Parameter (im Blut des Patienten) gibt, mit deren Hilfe eine Aussage über das Fortbestehen der während SIT erworbenen Toleranz bzw. ein mögliches Therapieversagen getroffen werden kann. Mit Hilfe solcher Parameter könnten Patienten, die ein hohes Risiko haben beim nächsten Stichereignis systemisch zu reagieren, frühzeitig erkannt und ggf. das Fortführen bzw. die Wiedereinleitung der SIT empfohlen werden.

Eine Studie mit Insektengiftallergikern verwies 2012 auf eine mögliche Korrelation des Basophilen-Aktivierungstests (BAT) mit einem noch bestehenden Schutz. Patienten, die eine Provokation tolerierten, hatten deutlich niedrigere Level der Basophilenaktivierung als ein Patient, der allergisch reagierte (Erzen et al., 2012). Auch in weiteren Arbeiten wird dem BAT eine mögliche Rolle zum Monitoring der SIT bei Insektengiftallergikern zugeschrieben (Uyttebroek et al., 2014).

Aktuell richtet sich das Augenmerk der Forschung stark auf die spezifischen IgG4-Antikörper. Während jedoch in Studien bei der Gräser- und Birkenpollenallergie auch eine Korrelation zwischen abnehmender Basophilenaktivierung und der Zunahme der IgG4-Antikörper beschrieben wurde (Nopp et al., 2009), konnte diese Korrelation bislang für Insektengiftallergiker nicht gezeigt werden (Zitnik et al., 2012). IgG4 scheint zwar bestimmte Verlaufsmuster während der SIT aufzuweisen, es konnte jedoch keine anhaltende Korrelation mit dem klinischen Erfolg festgestellt werden. In frühen Untersuchungen zeigte sich lediglich eine Korrelation zum bestehenden klinischen Schutz zu Beginn der SIT, allerdings nicht mehr im weiteren Verlauf und nach Abschluss der SIT (Golden et al., 1992). Trotz Toleranzpersistenz fielen die IgG4-Werte nach Abschluss der SIT teils wieder auf Ausgangswertniveau (Golden et al., 1996; Möbs et al., 2015). Somit besteht

auch nicht die Möglichkeit, anhand des quantitativen IgG4-Werts eine Aussagekraft bzgl. noch bestehender Toleranz während oder nach SIT zu ziehen. Übereinstimmend mit der Literatur konnte auch in dieser Arbeit, wie in Kap. 4.5 gezeigt, kein signifikanter Unterschied zwischen geschützten und nicht geschützten Individuen hinsichtlich des IgG4-Werts gezeigt werden.

Da die Serumkonzentration des allergenspezifischen IgG somit nicht geeignet zum Monitoring erscheint, könnte möglicherweise die funktionelle Aktivität bedeutsam sein. Wie bereits in 5.1.1.3 erwähnt, rückt in diesem Zusammenhang die Blockierungsaktivität des Serums in das Forschungsinteresse. 2009 wurden diesbezüglich erstmals Ergebnisse auf dem Gebiet der Insektengiftallergie publiziert. Es konnte eine durch die SIT induzierte Inhibition der IgE-Bindung und IgE-vermittelten Antigenpräsentation beobachtet werden. Diese war zwei Jahre nach Beendigung der SIT allerdings nicht mehr nachweisbar (Varga et al., 2009).

Die Arbeitsgruppe für Klinisch-Experimentelle Allergologie der Dermatologie und Allergologie der Philipps-Universität Marburg ermittelte diesbezüglich folgende Ergebnisse. Anhand ELIFAB-Analysen (enzyme-linked immunosorbent facilitated antigen binding) wurden die Wespengiftallergiker des Patientenkollektivs dieser Arbeit (5-12 Jahre nach Abschluss der SIT) sowie Wespengiftallergiker vor und während (8-24 Monate nach Einleitung; Median=15) SIT untersucht. Bei dem ELIFAB-Assay handelt es sich um einen ELISA-basiertes, zellfreies Protokoll, das zur Detektion von Allergen-IgE Komplexen dient (Shamji et al., 2013). Es zeigte sich während SIT eine signifikant geringere IgE-Allergen-Komplexbildung und somit höhere Blockierungsaktivität im Serum als vor bzw. nach SIT (Möbs et al., 2015).

Ein möglicher Erklärungsansatz für die nicht anhaltende hohe Blockierungsaktivität des Serums ist der quantitative Abfall von IgG4-Antikörpern nach Abschluss der SIT. Dieser könnte bei Insektengiftallergikern auf das Ausbleiben der „natürlicher Boosterung“ zurückzuführen sein. Es wurde gezeigt, dass die IgG4-Konzentration am besten mit der Blockadekapazität des Serums korreliert. Dies bedeutet dann, dass bei fallenden IgG4-Konzentrationen auch die Blockierungsaktivität des Serums abnimmt (Möbs et al., 2015). Es zeigen sich jedoch starke individuelle Schwankungen, so dass

keine „Cut-off“ Werte für eine Aussage bzgl. des bestehenden Schutzes herangezogen werden können. Ggf. könnte allerdings die Betrachtung des individuellen Verlaufs des IgG4 eines einzelnen Patienten hilfreich sein, um die Allergentoleranz bzw. den „Schutzstatus“ zu beurteilen.

Gräser- oder Birkenpollenallergiker sind jede Saison wiederkehrend dem natürlichen Allergen ausgesetzt. Insektengiftallergiker dagegen sind stets darum bemüht, mögliche Stiche zu vermeiden. Ob die nach Abschluss der SIT wieder abnehmende Blockierungsaktivität des Serums bei Insektengiftallergikern mit einem erhöhten Risiko für erneute allergische Stichreaktionen im Sinne eines Verlustes des erworbenen Schutzes einhergeht, bleibt bislang wie zuvor erwähnt unklar. Um dieses zu evaluieren, müssten weitere Untersuchungen mit größeren Patientenkollektiven, die einen erneuten Feldstich nach erfolgreicher SIT hatten, und/oder Stichprovokationen durchgeführt werden, was sich aus ethischer Sicht schwierig gestaltet.

Weitere Forschungsansätze sind bereits in Studien mit Gräserpollenallergikern gemacht worden. Hier konnte gezeigt werden, dass es während SIT nicht nur zu einem quantitativen Anstieg des IgG4 kommt, sondern die blockierenden Eigenschaften des Serums in erfolgreich mit SIT behandelten Allergikern deutlich erhöht sind. Bei der Placebogruppe fand sich diese Zunahme der blockierenden Eigenschaften nicht (Wachholz et al., 2003). Später wurde gezeigt, dass es nach etwa zwei Monaten SIT zu dem Anstieg der blockierenden Eigenschaften des IgG4 kam und dieser zeitlich auch mit dem Abfall der Hauttestreaktivität (allerdings nur mit der Spätphasereaktion) korrelierte (Francis et al., 2008). Eine Studie mit Birkenpollenallergikern konnte eine Hemmung der Antigenpräsentation und Histaminfreisetzung durch Basophile in den ersten zwei Therapiejahren bestätigen (Wurtzen et al., 2008).

Neben der Frage nach geeigneten Laborparametern zur Überprüfung des Toleranzstatus stellt sich die Frage, welche Möglichkeiten es gibt, den Schutz dauerhaft – auch Jahre nach Abschluss der SIT – aufrecht zu erhalten. Ein sehr kostspieliger und eine hohe Patienten-Compliance erfordernder Ansatz ist das dauerhafte Fortführen der Therapie. Bislang ist dies laut Leitlinie lediglich bei Patienten mit Mastozytose oder bestimmten Risikofaktoren (siehe 1.4.2) indiziert (Przybilla et al., 2011). In den letzten Jahren kam verstärkt die Frage

nach sogenannten „Booster-Injektionen“ auf. Darunter werden einmalige bzw. repetitive Injektionen des entsprechenden Insektengifts nach Beendigung der SIT nach leitliniengerechten Therapiedauer verstanden. Diese Booster-Injektionen werden kontrovers diskutiert, insbesondere da in der Vergangenheit gezeigt werden konnte, dass es bei einem behandlungsfreien Intervall von sechs Monaten vermehrt zu systemischen anaphylaktischen Reaktionen kam (Goldberg & Confino-Cohen, 2007). Andererseits wurde postuliert, dass auch bei einem Behandlungsintervall von sechs Monaten die Toleranz aufrechterhalten werden kann (Baenkler et al., 2005). Einen möglichen Grund für die Diskrepanz stellt die unterschiedliche Zusammenstellung des Patientenkollektivs mit einer vorherrschend Bienengiftallergiker- (Goldberg & Confino-Cohen, 2007) bzw. Wespengiftallergikerkohorte (Baenkler et al., 2005) dar. Da bei Bienengiftallergikern in der Literatur generell schwerere Reaktionen und häufigeres Therapieversagen beschrieben worden sind, ist dies eine mögliche Ursache für die Divergenz der Studienergebnisse. Außerdem handelt es sich bei den Patienten in den o.g. Studien größtenteils um Patienten, die bei Extension der Behandlungsintervalle noch nicht über fünf Jahre hyposensibilisiert worden waren.

Ob bei Allergikern, die die empfohlene Therapiedauer von fünf Jahren absolviert haben, Booster-Injektionen die Aufrechterhaltung der Toleranz sicherstellen könnten, bleibt zu klären. Denkbar wäre, dass es durch diese Booster-Injektionen zur erneuten IgG4-Produktion nach Aktivierung spezifischer Gedächtnis B-Zellen kommt. Hierdurch wiederum könnte die Blockadeaktivität des Serums steigen und bei erneuter Allergenexposition zur geringeren IgE-Allergen-Komplexbildung führen, wodurch eine allergische Reaktion verhindert wird. Die Toleranz, die während der SIT erlangt wird, könnte also über diesen Mechanismus durch Booster-Injektionen aufrechterhalten werden. In welcher Dosierung bzw. in welchen Intervallen diese Booster-Injektionen verabreicht werden sollten, bleibt aktuell allerdings noch unklar und die Beantwortung dieser Frage verlangt weitere intensive Forschung.

Im klinischen Alltag stellt sich die Frage, was man Patienten zum Beispiel zehn Jahre nach Abschluss der SIT empfehlen kann. Da es derzeit immer noch keinen zuverlässigen Parameter als Toleranzindikator gibt, sollte der

behandelnde Arzt den Patienten dringlich darauf hinweisen, dass er stets ein (haltbares und vollständiges) Notfallset mit sich führen sollte. Auch sollte der Patient mit der Handhabung vertraut sein und diese ggf. im Verlauf erneut erläutert werden.

Die Frage, ob die Messung von beispielsweise IgG4-Antikörpern sinnvoll ist, kann zunächst nur teilweise beantwortet werden. Zwar scheint eine Korrelation zur Blockierungskapazität des Serums zu bestehen, allerdings müsste man in diesem Zusammenhang jeweils den individuellen IgG4-Verlauf eines Patienten (vor, während und nach SIT) beurteilen, da es derzeit keinerlei standardisierten „Cut-off“-Werte gibt. Weitere Studien mit Patienten nach Abschluss der SIT und ggf. sogar Stichprovokationen Jahre nach Abschluss der SIT könnten hilfreich sein, um die Aussagekraft o.g. Parameter besser beurteilen und konkretere Therapieempfehlungen für die Patienten aussprechen zu können.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aalberse, R. C., Stapel, S. O., Schuurman, J., & Rispens, T. (2009). Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clin Exp Allergy*, 39(4), 469-477
- Ajduk, J., Marinic, I., Aberle, N., Rabatic, S., & Gagro, A. (2008). Effect of house dust mite immunotherapy on transforming growth factor beta1-producing T cells in asthmatic children. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 100(4), 314-322
- Akdis, C. A., & Akdis, M. (2015). Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. *World Allergy Organ J*, 8(1), 17
- Akdis, C. A., Blaser, K., & Akdis, M. (2004). Apoptosis in tissue inflammation and allergic disease. *Curr Opin Immunol*, 16(6), 717-723
- Akdis, C. A., Blesken, T., Akdis, M., Wuthrich, B., & Blaser, K. (1998). Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest*, 102(1), 98-106
- Akdis, M. (2009). Immune tolerance in allergy. *Curr Opin Immunol*, 21(6), 700-707
- Akkoc, T., Akdis, M., & Akdis, C. A. (2011). Update in the mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy Asthma Immunol Res*, 3(1), 11-20
- Annala, I. T., Karjalainen, E. S., Annala, P. A., & Kuusisto, P. A. (1996). Bee and wasp sting reactions in current beekeepers. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 77(5), 423-427
- Antunez, C., Mayorga, C., Corzo, J. L., Jurado, A., & Torres, M. J. (2008). Two year follow-up of immunological response in mite-allergic children treated with sublingual immunotherapy. Comparison with subcutaneous administration. *Pediatr Allergy Immunol*, 19(3), 210-218
- Asano, M., Toda, M., Sakaguchi, N., & Sakaguchi, S. (1996). Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med*, 184(2), 387-396
- Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J., & Hafler, D. A. (2001). CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol*, 167(3), 1245-1253
- Baenkler, H. W., Meusser-Storm, S., & Eger, G. (2005). Continuous immunotherapy for hymenoptera venom allergy using six month intervals. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 33(1), 7-14
- Behring, & Kitasato. (1965). [On the development of immunity to diphtheria and tetanus in animals]. *Dtsch Med Wochenschr*, 90(49), 2183
- Bellinghausen, I., Klostermann, B., Knop, J., & Saloga, J. (2003). Human CD4+CD25+ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress TH1 and TH2 cytokine production. *J Allergy Clin Immunol*, 111(4), 862-868
- Bellinghausen, I., Knop, J., & Saloga, J. (2006). [Mechanisms of specific immunotherapy]. *Hautarzt*, 57(10), 855-859
- Benjaponpitak, S., Oro, A., Maguire, P., Marinkovich, V., DeKruyff, R. H., & Umetsu, D. T. (1999). The kinetics of change in cytokine production by CD4 T cells during conventional allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 103(3 Pt 1), 468-475
- Bilo, B. M., Ruëff, F., Mosbech, H., Bonifazi, F., Oude-Elberink, J. N., & Hypersensitivity, E. I. G. o. I. V. (2005). Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy*, 60(11), 1339-1349
- Bjornsson, E., Janson, C., Plaschke, P., Norrman, E., & Sjoberg, O. (1995). Venom allergy in adult Swedes: a population study. *Allergy*, 50(10), 800-805
- Bohle, B., Kinaciyan, T., Gerstmayr, M., Radakovics, A., Jahn-Schmid, B., & Ebner, C. (2007). Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation. *J Allergy Clin Immunol*, 120(3), 707-713
- Bonadonna, P., Perbellini, O., Passalacqua, G., Caruso, B., Colarossi, S., Dal Fior, D., Castellani, L., Bonetto, C., Frattini, F., Dama, A., Martinelli, G., Chilosi, M., Senna, G., Pizzolo, G., & Zanotti, R. (2009). Clonal mast cell disorders in



- patients with systemic reactions to Hymenoptera stings and increased serum tryptase levels. *J Allergy Clin Immunol*, 123(3), 680-686
- Bonifazi, F., Jutel, M., Bilo, B. M., Birnbaum, J., Muller, U., & Hypersensitivity, E. I. G. o. I. V. (2005). Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice. *Allergy*, 60(12), 1459-1470
- Bousquet, J., Braquemon, P., Feinberg, J., Guerin, B., Maasch, H., & Michel, F. B. (1986). Specific IgE response before and after rush immunotherapy with a standardized allergen or allergoid in grass pollen allergy. *Ann Allergy*, 56(6), 456-459
- Bousquet, J., Locket, R., & Mallin, H. J. (1998). Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J Allergy Clin Immunol*, 102(4 Pt 1), 558-562
- Bousquet, J., Menardo, J. L., Aznar, R., Robinet-Levy, M., & Michel, F. B. (1984). Clinical and immunologic survey in beekeepers in relation to their sensitization. *J Allergy Clin Immunol*, 73(3), 332-340
- Boyle, R. J., Elremeli, M., Hockenhull, J., Cherry, M. G., Bulsara, M. K., Daniels, M., & Oude Elberink, J. N. (2012). Venom immunotherapy for preventing allergic reactions to insect stings. *Cochrane Database Syst Rev*, 10, CD008838
- Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., Paep, B., Clark, L. B., Yasayko, S. A., Wilkinson, J. E., Galas, D., Ziegler, S. F., & Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*, 27(1), 68-73
- Carballada, F., Boquete, M., Nunez, R., Lombardero, M., & de la Torre, F. (2010). Follow-up of venom immunotherapy (VIT) based on conventional techniques and monitoring of immunoglobulin E to individual venom allergens. *J Invest Allergol Clin Immunol*, 20(6), 506-513
- Chapman, M. D. (2008). Allergen nomenclature. *Clin Allergy Immunol*, 21, 47-58
- Charpin, D., Birnbaum, J., Lanteaume, A., & Vervloet, D. (1992). Prevalence of allergy to hymenoptera stings in different samples of the general population. *J Allergy Clin Immunol*, 90(3 Pt 1), 331-334
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., & Wahl, S. M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*, 198(12), 1875-1886
- Dasgupta, A., & Saxena, R. (2012). Regulatory T cells: a review. *Natl Med J India*, 25(6), 341-351
- de la Torre-Morin, F., Garcia-Robaina, J. C., Vazquez-Moncholi, C., Fierro, J., & Bonnet-Moreno, C. (1995). Epidemiology of allergic reactions in beekeepers: a lower prevalence in subjects with more than 5 years exposure. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 23(3), 127-132
- Djuretic, I. M., Levanon, D., Negreanu, V., Groner, Y., Rao, A., & Ansel, K. M. (2007). Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nat Immunol*, 8(2), 145-153
- Dubois, A. E. (2003). Investigational and clinical use of the sting challenge. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 3(4), 283-285
- Durham, S. R., Varney, V., Gaga, M., Frew, A. J., Jacobson, M., & Kay, A. B. (1991). Immunotherapy and allergic inflammation. *Clin Exp Allergy*, 21 Suppl 1, 206-210
- Eberlein-Konig, B., Ullmann, S., Thomas, P., & Przybilla, B. (1995). Tryptase and histamine release due to a sting challenge in bee venom allergic patients treated successfully or unsuccessfully with hyposensitization. *Clin Exp Allergy*, 25(8), 704-712
- Ebner, C., Siemann, U., Bohle, B., Willheim, M., Wiedermann, U., Schenk, S., Klotz, F., Ebner, H., Kraft, D., & Scheiner, O. (1997). Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative

- responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phl p 1, a major grass pollen allergen. *Clin Exp Allergy*, 27(9), 1007-1015
- Elkord, E. (2009). Frequency of human T regulatory cells in peripheral blood is significantly reduced by cryopreservation. *J Immunol Methods*, 347(1-2), 87-90
- Erzen, R., Kosnik, M., Silar, M., & Korosec, P. (2012). Basophil response and the induction of a tolerance in venom immunotherapy: a long-term sting challenge study. *Allergy*, 67(6), 822-830
- Fernandez, J., Blanca, M., Soriano, V., Sanchez, J., & Juarez, C. (1999). Epidemiological study of the prevalence of allergic reactions to Hymenoptera in a rural population in the Mediterranean area. *Clin Exp Allergy*, 29(8), 1069-1074
- Ferrante, A., Mocatta, F., & Goh, D. H. (1986). Changes in IgG and IgE antibody levels to bee venom during immunotherapy. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 81(3), 284-287
- Francis, J. N., James, L. K., Paraskevopoulos, G., Wong, C., Calderon, M. A., Durham, S. R., & Till, S. J. (2008). Grass pollen immunotherapy: IL-10 induction and suppression of late responses precedes IgG4 inhibitory antibody activity. *J Allergy Clin Immunol*, 121(5), 1120-1125 e1122
- Franken, H. H., Dubois, A. E., Minkema, H. J., van der Heide, S., & de Monchy, J. G. (1994). Lack of reproducibility of a single negative sting challenge response in the assessment of anaphylactic risk in patients with suspected yellow jacket hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*, 93(2), 431-436
- Gehlhar, K., Schlaak, M., Becker, W., & Bufe, A. (1999). Monitoring allergen immunotherapy of pollen-allergic patients: the ratio of allergen-specific IgG4 to IgG1 correlates with clinical outcome. *Clin Exp Allergy*, 29(4), 497-506
- Gell, P. C. R. (1963). *Clinical aspects of immunology*: Blackwell Scientific Publications Ltd.
- Gershon, R. K., Cohen, P., Hencin, R., & Liebhaver, S. A. (1972). Suppressor T cells. *J Immunol*, 108(3), 586-590
- Gleich, G. J., Zimmermann, E. M., Henderson, L. L., & Yunginger, J. W. (1982). Effect of immunotherapy on immunoglobulin E and immunoglobulin G antibodies to ragweed antigens: a six-year prospective study. *J Allergy Clin Immunol*, 70(4), 261-271
- Goldberg, A., & Confino-Cohen, R. (1997). Timing of venom skin tests and IgE determinations after insect sting anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*, 100(2), 182-184
- Goldberg, A., & Confino-Cohen, R. (2007). Effectiveness of maintenance bee venom immunotherapy administered at 6-month intervals. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 99(4), 352-357
- Golden, D. B. (2010). Long-term outcome after venom immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 10(4), 337-341
- Golden, D. B., Addison, B. I., Gadde, J., Kagey-Sobotka, A., Valentine, M. D., & Lichtenstein, L. M. (1989b). Prospective observations on stopping prolonged venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 84(2), 162-167
- Golden, D. B., Kagey-Sobotka, A., & Lichtenstein, L. M. (2000). Survey of patients after discontinuing venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 105(2 Pt 1), 385-390
- Golden, D. B., Kwiterovich, K. A., Kagey-Sobotka, A., Valentine, M. D., & Lichtenstein, L. M. (1996). Discontinuing venom immunotherapy: outcome after five years. *J Allergy Clin Immunol*, 97(2), 579-587
- Golden, D. B., Lawrence, I. D., Hamilton, R. H., Kagey-Sobotka, A., Valentine, M. D., & Lichtenstein, L. M. (1992). Clinical correlation of the venom-specific IgG antibody level during maintenance venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 90(3 Pt 1), 386-393
- Golden, D. B., Marsh, D. G., Freidhoff, L. R., Kwiterovich, K. A., Addison, B., Kagey-Sobotka, A., & Lichtenstein, L. M. (1997). Natural history of Hymenoptera venom sensitivity in adults. *J Allergy Clin Immunol*, 100(6 Pt 1), 760-766

- Golden, D. B., Marsh, D. G., Kagey-Sobotka, A., Freidhoff, L., Szkló, M., Valentine, M. D., & Lichtenstein, L. M. (1989a). Epidemiology of insect venom sensitivity. *JAMA*, 262(2), 240-244
- Golden, D. B., Meyers, D. A., Kagey-Sobotka, A., Valentine, M. D., & Lichtenstein, L. M. (1982). Clinical relevance of the venom-specific immunoglobulin G antibody level during immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 69(6), 489-493
- Golubovskaya, V., & Wu, L. (2016). Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel)*, 8(3)
- Gould, H. J., & Sutton, B. J. (2008). IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol*, 8(3), 205-217
- Grigoreas, C., Galatas, I. D., Kiamouris, C., & Papaioannou, D. (1997). Insect-venom allergy in Greek adults. *Allergy*, 52(1), 51-57
- Grindebacke, H., Larsson, P., Wing, K., Rak, S., & Rudin, A. (2009). Specific immunotherapy to birch allergen does not enhance suppression of Th2 cells by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells during pollen season. *J Clin Immunol*, 29(6), 752-760
- Haeblerli, G., Bronnimann, M., Hunziker, T., & Muller, U. (2003). Elevated basal serum tryptase and hymenoptera venom allergy: relation to severity of sting reactions and to safety and efficacy of venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy*, 33(9), 1216-1220
- Hahn, H., Kaufmann, S H E; Schulz, T F; Suerbaum, S. (2008). *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie (6. Auflage)*: Springer Verlag.
- Haugaard, L., Norregaard, O. F., & Dahl, R. (1991). In-hospital sting challenge in insect venom-allergic patients after stopping venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 87(3), 699-702
- Haye, R., & Dosen, L. K. (2005). Insect sting allergy. A study from 1980 to 2003 of patients who started treatment with venom immunotherapy between 1980 and 1998. *Clin Mol Allergy*, 3, 12
- Hiepe, F., & Dorner, T. (2005). [Autoantibodies and antibody-secreting cells]. *Z Rheumatol*, 64(6), 389-395
- Ho, F., Lortan, J. E., MacLennan, I. C., & Khan, M. (1986). Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations. *Eur J Immunol*, 16(10), 1297-1301
- Hof, H. D., R. (2009). *Medizinische Mikrobiologie (6.Auflage)*: Georg Thieme Verlag.
- Hoffman, D. R., & Jacobson, R. S. (1984). Allergens in hymenoptera venom XII: how much protein is in a sting? *Ann Allergy*, 52(4), 276-278
- Hompes S, K. J., Scherer K, Treudler R, Przybilla B., & Henzgen M, W. M. (2008). Erste Daten der Pilotphase des Anaphylaxie-Registers im deutschsprachigen Raum. *Allergo Journal*(7), 550-555
- Huber, B. (2006). [100 years of allergy: Clemens von Pirquet - his idea of allergy and its immanent concept of disease]. *Wien Klin Wochenschr*, 118(19-20), 573-579
- Hunt, K. J., Valentine, M. D., Sobotka, A. K., Benton, A. W., Amodio, F. J., & Lichtenstein, L. M. (1978). A controlled trial of immunotherapy in insect hypersensitivity. *N Engl J Med*, 299(4), 157-161
- Incorvaia, C., Mauro, M., & Pastorello, E. A. (1997). Hymenoptera stings in conscripts. *Allergy*, 52(6), 680-681
- Ishizaka, K., Ishizaka, T., & Hornbrook, M. M. (1966). Physico-chemical properties of human reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *J Immunol*, 97(1), 75-85
- Jeannin, P., Lecoanet, S., Delneste, Y., Gauchat, J. F., & Bonnefoy, J. Y. (1998). IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J Immunol*, 160(7), 3555-3561
- Johansson, S. G., & Bennich, H. (1967). Immunological studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin. *Immunology*, 13(4), 381-394
- Jones, S. M., Pons, L., Roberts, J. L., Scurlock, A. M., Perry, T. T., Kulis, M., Shreffler, W. G., Steele, P., Henry, K. A., Adair, M., Francis, J. M., Durham, S., Vickery,

- B. P., Zhong, X., & Burks, A. W. (2009). Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 124(2), 292-300, 300 e291-297
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., & Enk, A. H. (2001). Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med*, 193(11), 1285-1294
- Jutel, M., Akdis, M., Blaser, K., & Akdis, C. A. (2006b). Mechanisms of allergen specific immunotherapy--T-cell tolerance and more. *Allergy*, 61(7), 796-807
- Jutel, M., Akdis, M., Budak, F., Aebischer-Casaulta, C., Wrzyszc, M., Blaser, K., & Akdis, C. A. (2003). IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol*, 33(5), 1205-1214
- Jutel, M., Blaser, K., & Akdis, C. A. (2006a). The role of histamine in regulation of immune responses. *Chem Immunol Allergy*, 91, 174-187
- Jutel, M., Van de Veen, W., Agache, I., Azkur, K. A., Akdis, M., & Akdis, C. A. (2013). Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and novel ways for vaccine development. *Allergol Int*, 62(4), 425-433
- Kalyoncu, A. F., Demir, A. U., Ozcan, U., Ozkuyumcu, C., Sahin, A. A., & Baris, Y. I. (1997). Bee and wasp venom allergy in Turkey. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 78(4), 408-412
- Kay, A. B. (2000). Overview of 'allergy and allergic diseases: with a view to the future'. *Br Med Bull*, 56(4), 843-864
- Keating, M. U., Kagey-Sobotka, A., Hamilton, R. G., & Yunginger, J. W. (1991). Clinical and immunologic follow-up of patients who stop venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 88(3 Pt 1), 339-348
- King, T. P., Hoffman, D., Lowenstein, H., Marsh, D. G., Platts-Mills, T. A., & Thomas, W. (1994). Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. *Int Arch Allergy Immunol*, 105(3), 224-233
- Klein, J. S., & Yocum, M. W. (1995). Underreporting of anaphylaxis in a community emergency room. *J Allergy Clin Immunol*, 95(2), 637-638
- Kleine-Tebbe, J., Bufe, A., Ebner, C., Eigenmann, P., Friedrichs, F., Fuchs, T., Huttegger, I., Jung, K., Klimek, L., Kopp, M., Lässig, W., Merk, H., Niggemann, B., Rabe, U., Saloga, J., Schmid-Grendelmeier, P., Sitter, H., Virchow, J., Wagenmann M, Wedi, B., & Worm, M. (2009). Die spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) bei IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), des Ärzteverbandes Deutscher Allergologen (ÄDA), der Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin (GPA), der Österreichischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie (ÖGAI) und der Schweizerischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie (SGAI). *Allergo J*(18), 508-537
- Köhler, J., Blank, S., Muller, S., Bantleon, F., Frick, M., Huss-Marp, J., Lidholm, J., Spillner, E., & Jakob, T. (2014). Component resolution reveals additional major allergens in patients with honeybee venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 133(5), 1383-1389, 1389 e1381-1386
- Kosnik, M., Silar, M., Bajrovic, N., Music, E., & Korosec, P. (2005). High sensitivity of basophils predicts side-effects in venom immunotherapy. *Allergy*, 60(11), 1401-1406
- Lagier, B., Pons, N., Rivier, A., Chanal, I., Chanez, P., Bousquet, J., & Pene, J. (1995). Seasonal variations of interleukin-4 and interferon-gamma release by peripheral blood mononuclear cells from atopic subjects stimulated by polyclonal activators. *J Allergy Clin Immunol*, 96(6 Pt 1), 932-940
- Lang, R., & Hawranek, T. (2006). Hymenoptera venom immunotherapy and field stings. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 16(4), 224-231

- Lerch, E., & Muller, U. R. (1998). Long-term protection after stopping venom immunotherapy: results of re-stings in 200 patients. *J Allergy Clin Immunol*, 101(5), 606-612
- Levings, M. K., Sangregorio, R., & Roncarolo, M. G. (2001). Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med*, 193(11), 1295-1302
- Light, W. C., Reisman, R. E., Shimizu, M., & Arbesman, C. E. (1977). Clinical application of measurements of serum level of bee venom-specific IgE and IgG. *J Allergy Clin Immunol*, 59(3), 247-253
- Liu, W., Putnam, A. L., Xu-Yu, Z., Szot, G. L., Lee, M. R., Zhu, S., Gottlieb, P. A., Kapranov, P., Gingeras, T. R., Fazekas de St Groth, B., Clayberger, C., Soper, D. M., Ziegler, S. F., & Bluestone, J. A. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med*, 203(7), 1701-1711
- Mamessier, E., Nieves, A., Lorec, A. M., Dupuy, P., Pinot, D., Pinet, C., Vervloet, D., & Magnan, A. (2008). T-cell activation during exacerbations: a longitudinal study in refractory asthma. *Allergy*, 63(9), 1202-1210
- Mantel, P. Y., Kuipers, H., Boyman, O., Rhyner, C., Ouaked, N., Ruckert, B., Karagiannidis, C., Lambrecht, B. N., Hendriks, R. W., Cramer, R., Akdis, C. A., Blaser, K., & Schmidt-Weber, C. B. (2007). GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. *PLoS Biol*, 5(12), e329
- Marogna, M., Spadolini, I., Massolo, A., Canonica, G. W., & Passalacqua, G. (2010). Long-lasting effects of sublingual immunotherapy according to its duration: a 15-year prospective study. *J Allergy Clin Immunol*, 126(5), 969-975
- Meiler, F., Zumkehr, J., Klunker, S., Ruckert, B., Akdis, C. A., & Akdis, M. (2008). In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. *J Exp Med*, 205(12), 2887-2898
- Mittag, D., Scholzen, A., Varese, N., Baxter, L., Paukovics, G., Harrison, L. C., Rolland, J. M., & O'Hehir, R. E. (2010). The effector T cell response to ryegrass pollen is counterregulated by simultaneous induction of regulatory T cells. *J Immunol*, 184(9), 4708-4716
- Möbs, C., Ipsen, H., Mayer, L., Slotosch, C., Petersen, A., Wurtzen, P. A., Hertl, M., & Pfutzner, W. (2012). Birch pollen immunotherapy results in long-term loss of Bet v 1-specific TH2 responses, transient TR1 activation, and synthesis of IgE-blocking antibodies. *J Allergy Clin Immunol*, 130(5), 1108-1116 e1106
- Möbs, C., Muller, J., Rudzio, A., Pickert, J., Blank, S., Jakob, T., Spillner, E., & Pfutzner, W. (2015). Decline of Ves v 5-specific blocking capacity in wasp venom-allergic patients after stopping allergen immunotherapy. *Allergy*, 70(6), 715-719
- Möbs, C., Slotosch, C., Löffler, H., Jakob, T., Hertl, M., & Pfutzner, W. (2010). Birch pollen immunotherapy leads to differential induction of regulatory T cells and delayed helper T cell immune deviation. *J Immunol*, 184(4), 2194-2203
- Müller, U. (1990). *Insect Sting Allergy: Clinical picture, diagnosis and treatment* Gustav Fischer.
- Müller, U., Berchtold, E., & Helbling, A. (1991). Honeybee venom allergy: results of a sting challenge 1 year after stopping successful venom immunotherapy in 86 patients. *J Allergy Clin Immunol*, 87(3), 702-709
- Müller, U., Helbling, A., & Berchtold, E. (1992). Immunotherapy with honeybee venom and yellow jacket venom is different regarding efficacy and safety. *J Allergy Clin Immunol*, 89(2), 529-535
- Müller, U., Mosbech, H., & (1993). Immunotherapy with Hymenoptera venoms. Position paper. *Allergy*(48), 37-46
- Müller, U., Thurnheer, U., Patrizzi, R., Spiess, J., & Hoigne, R. (1979). Immunotherapy in bee sting hypersensitivity. Bee venom versus wholebody extract. *Allergy*, 34(6), 369-378

- Natvig, J. B., & Kunkel, H. G. (1973). Human immunoglobulins: classes, subclasses, genetic variants, and idiotypes. *Adv Immunol*, 16, 1-59
- Niedoszytko, M., de Monchy, J., van Doormaal, J. J., Jassem, E., & Oude Elberink, J. N. (2009). Mastocytosis and insect venom allergy: diagnosis, safety and efficacy of venom immunotherapy. *Allergy*, 64(9), 1237-1245
- Nieminen, K., Laaksonen, K., & Savolainen, J. (2009). Three-year follow-up study of allergen-induced in vitro cytokine and signalling lymphocytic activation molecule mRNA responses in peripheral blood mononuclear cells of allergic rhinitis patients undergoing specific immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol*, 150(4), 370-376
- Noon, L. (1911). Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet*
- Nopp, A., Cardell, L. O., Johansson, S. G., & Oman, H. (2009). CD-sens: a biological measure of immunological changes stimulated by ASIT. *Allergy*, 64(5), 811-814
- Novembre, E., Cianferoni, A., Bernardini, R., Veltroni, M., Ingargiola, A., Lombardi, E., & Vierucci, A. (1998). Epidemiology of insect venom sensitivity in children and its correlation to clinical and atopic features. *Clin Exp Allergy*, 28(7), 834-838
- Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T., & Sakaguchi, S. (2008). Foxp3<sup>+</sup> natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(29), 10113-10118
- Ozdemir, C., Akdis, M., & Akdis, C. A. (2009). T regulatory cells and their counterparts: masters of immune regulation. *Clin Exp Allergy*, 39(5), 626-639
- Ozdemir, C., Kucuksezer, U. C., Akdis, M., & Akdis, C. A. (2011). Mechanisms of immunotherapy to wasp and bee venom. *Clin Exp Allergy*, 41(9), 1226-1234
- Palomares, O., Yaman, G., Azkur, A. K., Akkoc, T., Akdis, M., & Akdis, C. A. (2010). Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur J Immunol*, 40(5), 1232-1240
- Parker, J. L., Santrach, P. J., Dahlberg, M. J., & Yunginger, J. W. (1982). Evaluation of Hymenoptera-sting sensitivity with deliberate sting challenges: inadequacy of present diagnostic methods. *J Allergy Clin Immunol*, 69(2), 200-207
- Pereira-Santos, M. C., Baptista, A. P., Melo, A., Alves, R. R., Soares, R. S., Pedro, E., Pereira-Barbosa, M., Victorino, R. M., & Sousa, A. E. (2008). Expansion of circulating Foxp3<sup>+</sup>D25bright CD4<sup>+</sup> T cells during specific venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy*, 38(2), 291-297
- Pestka, S., Krause, C. D., Sarkar, D., Walter, M. R., Shi, Y., & Fisher, P. B. (2004). Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol*, 22, 929-979
- Peterson, R. A. (2012). Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol Pathol*, 40(2), 186-204
- Plewako, H., Wosinska, K., Arvidsson, M., Bjorkander, J., Skov, P. S., Hakansson, L., & Rak, S. (2006). Basophil interleukin 4 and interleukin 13 production is suppressed during the early phase of rush immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol*, 141(4), 346-353
- Przybilla, B., & Ruëff, F. (2010). Hymenoptera venom allergy. *J Dtsch Dermatol Ges*, 8(2), 114-127; quiz 128-130
- Przybilla, B., Ruëff, F., Walker, A., Răwer, H., Aberer, W., Bauer, C., Berdel, D., Biedermann, T., Brockow, K., Forster, J., Fuchs, T., Hamelmann, E., Jakob, T., Jarisch, R., Merk, H., Müller, U., Ott, H., Sitter, W., Urbanek, R., & Wedi, B. (2011). Diagnose und Therapie der Bienen -und Wespengiftallergie - Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), des Ärzteverbandes Deutscher Allergologen (ÄDA), der Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin (GPA), der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG) und der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin (DGKJ) in Zusammenarbeit mit der Österreichischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie (ÖGAI) und der

- Schweizerischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie (SGAI). *Allergo J*, 20, 318-339
- Radbruch, A., Muehlinghaus, G., Luger, E. O., Inamine, A., Smith, K. G., Dorner, T., & Hiepe, F. (2006). Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol*, 6(10), 741-750
- Radulovic, S., Jacobson, M. R., Durham, S. R., & Nouri-Aria, K. T. (2008). Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> cells in the nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol*, 121(6), 1467-1472, 1472 e1461
- Reisinger, J., Horak, F., Pauli, G., van Hage, M., Cromwell, O., Konig, F., Valenta, R., & Niederberger, V. (2005). Allergen-specific nasal IgG antibodies induced by vaccination with genetically modified allergens are associated with reduced nasal allergen sensitivity. *J Allergy Clin Immunol*, 116(2), 347-354
- Reisman, R. E. (1993). Duration of venom immunotherapy: relationship to the severity of symptoms of initial insect sting anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*, 92(6), 831-836
- Ring, J., Beyer, K., Biedermann, T., Bircher, A., Duda, D., Fischer, J., Friedrichs, F., Fuchs, T., Gieler, U., Jakob, T., Klimek, L., Lange, L., Merk, H., Niggemann, B., Pfaar, O., Przybilla, B., Ruëff, F., Rietschel, E., Schnadt, S., Seifert, R., Sitter, H., Varga, E., Taworm, M., & Brockow, K. (2014). Leitlinie zu Akuttherapie und Management der Anaphylaxie S2-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), des Ärzteverbands Deutscher Allergologen (AeDA), der Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin (GPA), der Deutschen Akademie für Allergologie und Umweltmedizin (DAAU), des Berufsverbands der Kinder- und Jugendärzte Deutschlands (BVKJ), der Österreichischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie (ÖGAI), der Schweizerischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie (SGAI), der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (DGAI), der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie (DGP), der Deutschen Gesellschaft für Psychosomatische Medizin (DGPM), der Arbeitsgemeinschaft Anaphylaxie Training und Edukation (AGATE) und der Patientenorganisation Deutscher Allergie- und Asthmabund (DAAB). *Allergo J Int*, 23, 36-52
- Ring, J., & Messmer, K. (1977). Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes. *Lancet*, 1(8009), 466-469
- Ring, J. B., K., Duda, D.; Eschenhagen, T.; Fuchs, T.; Huttegger, I.; Kapp, A.; Klimek, L.; Müller, U.; Niggemann, B.; Pfaar, O., & Przybilla, B. R., W.; Rietschel, E.; Ruëff, F.; Schnadt, S.; Tryba, M.; Worm, M.; Sitter, H.; Schultze-Werninghaus, G. (2007). Akuttherapie anaphylaktischer Reaktionen - Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), des Ärzteverbandes Deutscher Allergologen (ÄDA), der Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin (GPA) und der Deutschen Akademie für Allergologie und Umweltmedizin (DAAU). *Allergo J*(16), 420-434
- Robinson, D. S., Larche, M., & Durham, S. R. (2004). Tregs and allergic disease. *J Clin Invest*, 114(10), 1389-1397
- Romagnani, S. (2004). Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. *J Allergy Clin Immunol*, 113(3), 395-400
- Rudzio, A. (2015). Gestörte Immunregulation bei Hymenopterengiftallergie und ihre Korrektur im Rahmen der allergenspezifischen Immuntherapie (Dissertation).
- Ruëff, F., Bergmann, K. C., Brockow, K., Fuchs, T., Grubl, A., Jung, K., Klimek, L., Musken, H., Pfaar, O., Przybilla, B., Sitter, H., Wehrmann, W., German Society for, A., & Clinical, I. (2011). [Skin tests for diagnostics of allergic immediate-type reactions. Guideline of the German Society for Allergology and Clinical Immunology]. *Pneumologie*, 65(8), 484-495
- Ruëff, F., Przybilla, B., Bilo, M. B., Muller, U., Scheipl, F., Aberer, W., Birnbaum, J., Bodzenta-Lukaszyk, A., Bonifazi, F., Bucher, C., Campi, P., Darsow, U., Egger, C., Haeberli, G., Hawranek, T., Korner, M., Kucharewicz, I., Kuchenhoff, H.,

- Lang, R., Quercia, O., Reider, N., Severino, M., Sticherling, M., Sturm, G. J., & Wuthrich, B. (2009). Predictors of severe systemic anaphylactic reactions in patients with Hymenoptera venom allergy: importance of baseline serum tryptase—a study of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*, 124(5), 1047-1054
- Ruëff, F., Przybilla, B., Bilo, M. B., Müller, U., Scheipl, F., Seitz, M. J., Aberer, W., Bodzenta-Lukaszyk, A., Bonifazi, F., Campi, P., Darsow, U., Haeberli, G., Hawranek, T., Kuchenhoff, H., Lang, R., Quercia, O., Reider, N., Schmid-Grendelmeier, P., Severino, M., Sturm, G. J., Treudler, R., & Wuthrich, B. (2013). Clinical effectiveness of hymenoptera venom immunotherapy: a prospective observational multicenter study of the European academy of allergology and clinical immunology interest group on insect venom hypersensitivity. *PLoS One*, 8(5), e63233
- Ruëff, F., Przybilla, B., Müller, U., & Mosbech, H. (1996). The sting challenge test in Hymenoptera venom allergy. Position paper of the Subcommittee on Insect Venom Allergy of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy*(51), 216–225
- Ruëff, F., Przybilla, B., Fuchs, T., Gall, H., Rakoski, W., Stolz, W., Vieluf D., . (2000). Diagnose und Therapie der Bienen- und Wespengiftallergie - Positionspaper der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinischen Immunologie (DGAI). *Allergo J*(9), 458-472
- Schäfer, T., & Przybilla, B. (1996). IgE antibodies to Hymenoptera venoms in the serum are common in the general population and are related to indications of atopy. *Allergy*, 51(6), 372-377
- Schandene, L., Alonso-Vega, C., Willems, F., Gerard, C., Delvaux, A., Velu, T., Devos, R., de Boer, M., & Goldman, M. (1994). B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. *J Immunol*, 152(9), 4368-4374
- Schroeder, H. W., Jr., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*, 125(2 Suppl 2), S41-52
- Schulten, V., Tripple, V., Sidney, J., Greenbaum, J., Frazier, A., Alam, R., Broide, D., Peters, B., & Sette, A. (2014). Association between specific timothy grass antigens and changes in TH1- and TH2-cell responses following specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 134(5), 1076-1083
- Schumacher, M. J., Tveten, M. S., & Egen, N. B. (1994). Rate and quantity of delivery of venom from honeybee stings. *J Allergy Clin Immunol*, 93(5), 831-835
- Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S. I., Nanan, R., Kelleher, A., & Fazekas de St Groth, B. (2006). Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med*, 203(7), 1693-1700
- Shamji, M. H., Francis, J. N., Wurtzen, P. A., Lund, K., Durham, S. R., & Till, S. J. (2013). Cell-free detection of allergen-IgE cross-linking with immobilized phase CD23: inhibition by blocking antibody responses after immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 132(4), 1003-1005 e1001-1004
- Shamji, M. H., Ljorring, C., Francis, J. N., Calderon, M. A., Larche, M., Kimber, I., Frew, A. J., Ipsen, H., Lund, K., Wurtzen, P. A., & Durham, S. R. (2012). Functional rather than immunoreactive levels of IgG4 correlate closely with clinical response to grass pollen immunotherapy. *Allergy*, 67(2), 217-226
- Shevach, E. M. (2009). Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*, 30(5), 636-645
- Shreffler, W. G., Wanich, N., Moloney, M., Nowak-Wegrzyn, A., & Sampson, H. A. (2009). Association of allergen-specific regulatory T cells with the onset of clinical tolerance to milk protein. *J Allergy Clin Immunol*, 123(1), 43-52 e47
- Smyth, L. J., Eustace, A., Kolsum, U., Blaikely, J., & Singh, D. (2010). Increased airway T regulatory cells in asthmatic subjects. *Chest*, 138(4), 905-912



- Soyer, O. U., Akdis, M., Ring, J., Behrendt, H., Cramer, R., Lauener, R., & Akdis, C. A. (2013). Mechanisms of peripheral tolerance to allergens. *Allergy*, 68(2), 161-170
- Strupler, W., Wüthrich B., Schindler, C. & SAPALDIA-Team (1997). Prävalenz der Hymenopterengiftallergien in der Schweiz: eine epidemiologische und serologische Studie der SAPALDIA-Stichprobe. *Allergo J*(97(6)), 7-11
- Toda, A., & Piccirillo, C. A. (2006). Development and function of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol*, 80(3), 458-470
- Urbanek, R., Forster, J., Kuhn, W., & Ziupa, J. (1985). Discontinuation of bee venom immunotherapy in children and adolescents. *J Pediatr*, 107(3), 367-371
- Uyttebroek, A. P., Sabato, V., Faber, M. A., Cop, N., Bridts, C. H., Lapeere, H., De Clerck, L. S., & Ebo, D. G. (2014). Basophil activation tests: time for a reconsideration. *Expert Rev Clin Immunol*, 10(10), 1325-1335
- Van Ree, R., Van Leeuwen, W. A., Dieges, P. H., Van Wijk, R. G., De Jong, N., Brewczynski, P. Z., Kroon, A. M., Schilte, P. P., Tan, K. Y., Simon-Licht, I. F., Roberts, A. M., Stapel, S. O., & Aalberse, R. C. (1997). Measurement of IgE antibodies against purified grass pollen allergens (Lol p 1, 2, 3 and 5) during immunotherapy. *Clin Exp Allergy*, 27(1), 68-74
- Varga, E. M., Francis, J. N., Zach, M. S., Klunker, S., Aberer, W., & Durham, S. R. (2009). Time course of serum inhibitory activity for facilitated allergen-IgE binding during bee venom immunotherapy in children. *Clin Exp Allergy*, 39(9), 1353-1357
- Vollmar, A. Z., I.; Dinger, T. (2012). *Immunologie* (Vol. 2): Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.
- Wachholz, P. A., Soni, N. K., Till, S. J., & Durham, S. R. (2003). Inhibition of allergen-IgE binding to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 112(5), 915-922
- Wambre, E., DeLong, J. H., James, E. A., Torres-Chinn, N., Pflutzner, W., Möbs, C., Durham, S. R., Till, S. J., Robinson, D., & Kwok, W. W. (2014). Specific immunotherapy modifies allergen-specific CD4(+) T-cell responses in an epitope-dependent manner. *J Allergy Clin Immunol*, 133(3), 872-879 e877
- Wisniewski, J., Agrawal, R., & Woodfolk, J. A. (2013). Mechanisms of tolerance induction in allergic disease: integrating current and emerging concepts. *Clin Exp Allergy*, 43(2), 164-176
- Wurtzen, P. A., Lund, G., Lund, K., Arvidsson, M., Rak, S., & Ipsen, H. (2008). A double-blind placebo-controlled birch allergy vaccination study II: correlation between inhibition of IgE binding, histamine release and facilitated allergen presentation. *Clin Exp Allergy*, 38(8), 1290-1301
- Yamanaka, K., Yuta, A., Kakeda, M., Sasaki, R., Kitagawa, H., Gabazza, E. C., Okubo, K., Kurokawa, I., & Mizutani, H. (2009). Induction of IL-10-producing regulatory T cells with TCR diversity by epitope-specific immunotherapy in pollinosis. *J Allergy Clin Immunol*, 124(4), 842-845 e847
- Zhu, J., Cote-Sierra, J., Guo, L., & Paul, W. E. (2003). Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. *Immunity*, 19(5), 739-748
- Zitnik, S. E., Vesel, T., Avčin, T., Silar, M., Kosnik, M., & Korosec, P. (2012). Monitoring honeybee venom immunotherapy in children with the basophil activation test. *Pediatr Allergy Immunol*, 23(2), 166-172

## 7 Schriftenverzeichnis

### Originalarbeiten

Möbs, C., Müller, J., Rudzio, A., **Pickert, J.**, Blank, S., Jakob, T., Spillner, E., Pfützner, W. (2015). *Decline of Ves v 5-specific blocking capacity in wasp venom-allergic patients after stopping allergen immunotherapy.*  
Allergy, 70(6), 715-719

### Publizierte Abstracts und Kongressbeiträge

Möbs, C., **Pickert, J.**, Rudzio, A., Müller, J., Bantleon, F., Spillner, E., Pfützner, W. (2015). *Long-term outcome after discontinuation of hymenoptera venom-specific immunotherapy.*  
Exp Dermatol, 24(3), E3; 42. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologischer Forschung e.V. (ADF) 2015, Ulm

Möbs, C., Müller, J., **Pickert, J.**, Rudzio, A., Blank, S., Spillner, E., Pfützner, W. (2014). *Immune mechanisms of induction and long-term maintenance of allergen tolerance in patients allergic to hymenoptera venom.*  
Collegium Internationale Allergologicum 2014, Bonn

Müller, J., **Pickert, J.**, Rudzio, A., Blank S., Spillner, E., Möbs, C., Pfützner, W. (2014). *Detection of blocking antibody responses in patients with hymenoptera venom allergy by the ELIFAB assay.*  
Mainzer Allergieworkshop, 2014, Mainz sowie Allergo J Int 23(35): 66

Möbs, C., Müller, J., **Pickert, J.**, Rudzio, A., Blank, S., Spillner, E., Pfützner, W. (2014). *The ELIFAB assay: a new tool to characterize the blocking antibody activity in patients with hymenoptera venom allergy.*  
41. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologischer Forschung e.V. (ADF), AG Experimentelle Allergologie 2014, Köln

## **8 Verzeichnis akademischer Lehrer**

Adamkiewicz, Bartsch, Baum, Baumann, Becker, Berger, Bette, Bösner, Brehm, Cetin, Czubayko, Daut, Del Rey, Donner-Banzhoff, Fendrich, Feuser, Görg, Gress, Hadji, Hertl, Höffken, Hofmann, Holst, Hoyer, Hundt, Jacobsohn, Jerrentrup, Kann, Kill, Kinscherf, Kircher, Klose, Koolman, Köhler, König, Lill, Lohoff, Mahnken, Maier, Maisch, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Nimsky, Oertel, Olbert, Pagenstecher, Peterlein, Pfützner, Rausch, Renz, Richter, Rosenow, Rothmund, Röhm, Ruchholtz, Sahmland, Schäfer, Schieffer, Schu, Schütz, Seifert, Seitz, Sekundo, Sesterhenn, Sevinc, Sitter, Sommer, Steiniger, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wilhelm, Wulf, Wrocklage, Ziring

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meines Studiums und der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben:

Zunächst danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Wolfgang Pfützner für die Vergabe des interessanten Themas, die fachlichen Anregungen und Hilfestellungen sowie das entgegengebrachte Vertrauen. Ebenfalls danke ich Prof. Dr. Michael Hertl, der mir als Leiter der Klinik sowohl für wissenschaftliche als auch für klinische Fragen hilfsbereit zur Seite steht. Ein großer Dank geht außerdem an die Probanden dieser Studie.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen wissenschaftlichen Mitarbeitern der Klinik für Dermatologie und Allergologie des Universitätsklinikums Marburg bedanken. Mein außerordentlicher Dank gilt Herrn Dr. Christian Möbs, der mir geduldig alle aufkommenden Fragen beantwortete und für jedes Problem eine Lösung wusste, ich hätte mir keinen besseren Betreuer vorstellen können. Ein weiterer gesonderter Dank geht an Manuel Schulze-Dasbeck und Elke Hermann. Auch danke ich Dr. Kesper, ohne dessen Verständnis die Durchführung einiger Assays nicht möglich gewesen wäre.

Neben dem wissenschaftlichen Team danke ich allen ärztlichen und technischen Mitarbeitern der Klinik für Dermatologie und Allergologie Marburg, vor allem Sigrid Wagenknecht und Sabine Weimer für die Hilfestellung bei Organisation und Blutentnahmen.

Abschließend geht ein ganz besonderer Dank an meine lieben Freunde und Wegbegleiter (Danke Christian!) sowie meine Patentante Ulrike, ihr alle habt mich durch schwierige Zeiten im Studium und während der Anfertigung der Promotionsarbeit begleitet und allzeit unterstützt und motiviert, wenn es mir selber schwer fiel. Nicht vergessen möchte ich an dieser Stelle meine lieben Großeltern, ich wünsche mir, dass ihr auf irgendeinem Weg von der Fertigstellung der Arbeit erfahren habt, ich vermisse euch. Mein größter Dank gilt meinem Lieblingsbruder Christoph und meinen Eltern, die immer für mich da sind, mir mit Rat und Tat zur Seite stehen und nie an mir zweifeln, Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.